

**VERSUCHE ÜBER DIE HEMMUNG DER MENSCHLICHEN
SERUM-PSEUDOCHOLINESTERASE IN VITRO DURCH E 600
UND DIE REAKTIVIERBARKEIT MIT PAM**

von
Helmut Weiß
aus
Traunstein

1971

1972 № 4.1

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

**VERSUCHE ÜBER DIE HEMMUNG DER MENSCHLICHEN
SERUM-PSEUDOCHOLINESTERASE IN VITRO DURCH E 600
UND DIE REAKTIVIERBARKEIT MIT PAM**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Helmut Weiß
aus
Traunstein

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan:	Prof. Dr. G. Koch
Referent:	Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
Coreferent:	Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 10. 1971

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
I. <u>E i n l e i t u n g</u>	7
a) Chemisches Prinzip der Alkylphosphate	7
b) Giftwirkung der Alkylphosphate	7
aa) Hydrolytische Spaltung des Acetylcholins	8
bb) Phosphorylierung der Cholinesterasen	8
c) Reaktivierung der gehemmten Pseudocho- linesterase	8
d) Spontanreaktivierung	10
II. <u>K a s u i s t i k</u> (E 605-Vergiftungs- fälle)	13
1. <u>Fall I</u>	13
a) Anamnese	13
b) Obduktionsbefunde	13
c) Chemische Untersuchungen	14
aa) Mageninhalt	14
bb) Hemmung der Cholinesterase und ihre Reaktivierung mit PAM	14
d) Ergebnisse	14
2. <u>Fall II</u>	16
a) Anamnese	16
b) Klinische Untersuchung	16
c) Blutentnahme vor und nach Behand- lung mit Atropin und Toxogonin	17
d) Chemische Untersuchungen	17
aa) Magenspülflüssigkeit	17
bb) Urinuntersuchungen	17
cc) Bestimmung der Cholinesterase- aktivität des über mehrere Ta- ge aufbewahrten Blutserums	17

	<u>Seite</u>
dd) <u>Ergebnisse</u>	17
1. PCHE-Aktivität und Reaktivierung mit PAM bei Serum I	17
2. PCHE-Aktivität bei Serum II	20
3. Ergebnis für Serum I a	20
aa) Spontanreaktivierung	20
bb) Reaktivierbarkeit	20
4. Ergebnis für Serum I b	20
aa) Spontanreaktivierung	20
bb) Reaktivierbarkeit	21
5. Vergleich von Serum I a und Serum I b	21
aa) hinsichtlich der Spontanreaktivierung	21
bb) hinsichtlich der Reaktivierbarkeit	21
3. <u>Drei weitere tödliche E 605-Vergiftungsfälle</u>	21
III. <u>Problemstellung</u>	22
IV. <u>Experimenteller Teil</u>	25
1. <u>Untersuchungsmethodik</u>	25
a) Serumgewinnung	25
b) Durchführung der Versuche	25
c) Auswertung der Versuchsergebnisse	28
2. <u>Cholinesteraseaktivitäten der unvergifteten Seren</u>	29
a) Herstellung der Serumansätze	29
b) Cholinesteraseaktivität bei sofortiger Messung	30
c) PCHE-Aktivität nach Lagerung der unvergifteten Seren bei Raumtemperatur	30
d) PCHE-Aktivität nach Lagerung der unvergifteten Seren bei 5° C	30
e) Ergebnisse	31

	<u>Seite</u>
3. <u>Vergiftung der Seren 1 - 9 mit E 600</u>	31
a) Bestimmung einer für unsere in-vitro- Versuche geeigneten E 600-Vergiftungs- konzentration	32
b) Methodik der Vergiftung der Seren 1 - 9	33
c) Versuchsergebnisse nach Vergiftung der Seren 1 - 9 mit E 600	34
1. Hemmung der PCHE mit E 600	35
2. Spontanreaktivierung	36
a) nach Aufbewahrung der Seren bei Raumtemperatur	36
b) nach Aufbewahrung der Seren bei 5° C	37
c) Vergleich der Spontanreaktivie- rung bei Raumtemperatur und 5° C	37
aa) Aktivitätszunahme nach 5 - 7 Tagen	37
bb) Spontanreaktivierung nach 14 - 20 Tagen	38
cc) Ergebnisse im Vergleich zu Untersuchungen mit Pferde- serum	38
4. <u>Reaktivierung der mit E 600 vergifteten Seren 1 - 9 mit PAM</u>	38
a) Methodik der Reaktivierung	38
b) Versuchsergebnisse bei Reaktivierung der mit E 600, $2,33 \times 10^{-7}$ molar, vergifteten menschlichen Seren 1 - 9	39
aa) nach Aufbewahrung bei Raumtempe- ratur	39
bb) nach Aufbewahrung bei 5° C	40
cc) Vergleich der Reaktivierung der Seren bei den unterschiedlichen Lagerungstemperaturen	41

5. <u>Vergleich zwischen Zunahme der Spontanreaktivierung und Abnahme der Reaktivierbarkeit unter Angabe der zeitlichen Änderung der Reaktivierungsquotienten IR</u>	46
a) Definition des Index der Reaktivierbarkeit	48
b) Verlauf der Reaktivierungsquotienten nach Lagerung der Seren bei Raumtemperatur	48
c) Verlauf der Reaktivierungsquotienten nach Lagerung der Seren bei 50° C	51
6. <u>Makroskopische Veränderungen der Seren</u>	51
V. <u>D i s k u s s i o n</u>	52
VI. <u>Z u s a m m e n f a s s u n g</u>	54
VII. <u>L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s</u>	57

1. Einleitung

Aus der Gruppe der Alkylphosphate konnten sehr wirksame Insektengifte gefunden werden, sodaß in dem Zeitraum von 1940 bis heute die Entwicklung von Pflanzenschutzmitteln auf der Basis von organischen Phosphorverbindungen einen außerordentlich stürmischen Verlauf genommen hat. Die ersten derartigen Verbindungen wurden 1934 von SCHRADER entwickelt und bereits während des Krieges in Form der "Trilone" als Kriegsgifte bereitgestellt.

a) Chemisches Prinzip:

Nach SCHRADER (1957) haben alle wirksamen Alkylphosphate das folgende Strukturbild:

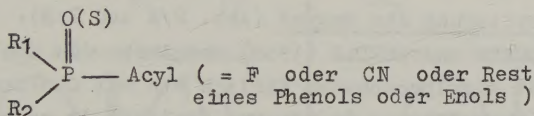


Abb. 1: Strukturbild der Alkylphosphate

Nach diesem Modell sind praktisch alle heute im Handel anzutreffenden insektiziden Phosphorsäureester aufgebaut. Hierzu gehören zahlreiche Ester der Dialkylthio- und Dithiophosphorsäuren, von denen der bekannteste Vertreter das E 605 (Parathion = Diäthyl-p-Nitrophenylthiophosphat) ist, welches immer wieder zu accidentieller Vergiftung, zu Vergiftungen in suicidalen Absicht führt und auch als Mordmittel diente.

b) Giftwirkung:

Alle Alkylphosphate sind für Warmblüter wegen der Blockierung der Cholinesterase schwere Gifte und führen daher durch Anhäufung von Acetylcholin zu den typischen Vergiftungserscheinungen.

aa) Hydrolytische Spaltung des Acetylcholins

Der physiologisch-chemische Vorgang der hydrolytischen Spaltung von Acetylcholin durch die Cholinesterase (Pseudocholinesterase des Blutserums) wird durch Alkylphosphate blockiert. Normalerweise entsteht durch Bindung des kationischen Teils des Acetylcholins an den anionischen Teil der Cholinesterase sowie durch Fixierung der Estergruppe des Acetylcholins an die Basis des esteratischen Teils des Enzyms ein Enzym-Substrat-Komplex (Abb. 2/1), aus dem durch eine komplizierte Wasserstoffbindung sowie Umordnung und Spaltung der Sauerstoff-Kohlenstoff-Bindung Cholin und acyliertes Enzym gebildet wird (Abb. 2/2). Das acylierte Enzym wird durch Wasser hydrolysiert, wobei Essigsäure und intaktes Enzym entsteht (Abb. 2/3).

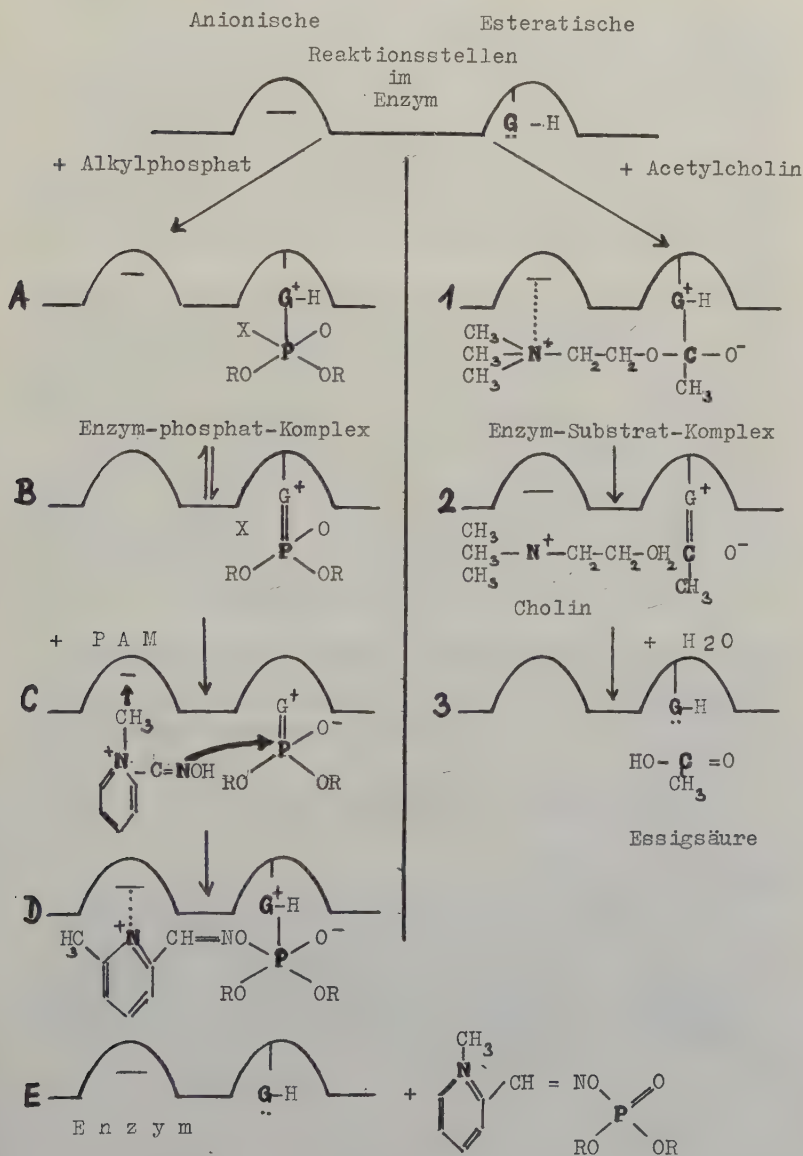
bb) Phosphorylierung des Enzyms (Abb. 2/A und 2/B):

Nach ERDMANN und LENDLE (1958) reagieren die Cholinesterasen mit Alkylphosphaten ähnlich wie mit Cholinestern. Die Phosphorylierung des Enzyms verläuft in verschiedenen Schritten und wird durch Temperaturerhöhung beschleunigt. An die esteratische Gruppe des Enzyms wird das Alkylphosphat unter Bildung eines Phosphat-Enzym-Komplexes (Abb. 2/A) gebunden. Aus diesem Komplex entsteht das phosphorylierte Enzym (Abb. 2/B), welches durch das schwach nucleophile Wasser hydrolytisch gespalten werden kann. Die Hydrolyse des phosphorylierten Enzyms dauert jedoch wesentlich länger als die Hydrolyse des acylierten Enzyms. Kann die Spaltung des phosphorylierten Enzyms nicht mehr erfolgen, was von der chemischen Struktur des Inhibitors abhängig ist, so ist die Hemmung der Cholinesterase irreversibel.

c) Reaktivierung der gehemmten PCHE:

WILSON und NACHMANSON (1955) konnten spezifische Reaktivatoren für die durch Alkylphosphate blockierten Cholinesterasen finden. Als eine der wirksamsten Verbindungen dieser

Abb. 2: Enzymatische Spaltung von Acetylcholin durch die Cholinesterase (1 - 2 - 3).
Blockierung der Cholinesterase durch Alkylphosphate (A,B) und Reaktivierung des Enzyms durch PAM (C - D - E).



Stoffgruppe hat sich das N-Methyljodid des Pyridin-2-Al-doxims, das sogenannte PAM, erwiesen.

Beim Vorliegen einer Alkylphosphatvergiftung bleibt der Alkylphosphatrest an der esteratischen Stelle des Enzyms gebunden, wodurch das Ferment blockiert ist (Abb. 2/B). Beim Hinzukommen von PAM, das mit seinem quaternären Stickstoff von der anionischen Stelle des Fermentes angezogen wird, kann die sogenannte nucleophile Gruppe der Verbindung - der durch Doppelbildung auf die esteratische Stelle des Enzyms gerichtete Oximrest - die Lösung des Alkylphosphates erreichen und damit das Ferment reaktivieren (Abb. 2/C, 2/D, 2/E).

HOBBIGER (1955) fand, daß die Reaktivierbarkeit mit der Dauer der Blockierung der Cholinesterase durch Alkylphosphat ständig abnimmt. Er deutete damals diesen Vorgang als T r a n s p h o s p h o r y l i e r u n g, worunter eine intramolekulare Umlagerung durch Verschiebung des Phosphatrestes am Ferment verstanden wird, sodaß dem Reaktivator kein Angriffspunkt mehr geboten wird. LORKE und KIMMERLE (1968) nehmen an, daß dabei eine stark phosphorylierte Form durch Entfernung einer Alkoxy-Gruppe mittels Hydrolyse entsteht, und sie bezeichnen diesen Vorgang als "Alterung".

Nach LORKE und KIMMERLE besitzt PAM folgende wichtigste Wirkungen:

1. In therapeutischen Dosen reaktiviert es gehemmte ACHE und PCHE.
2. In hohen Dosen hemmt es ACHE und PCHE.

d) Spontanreaktivierung

Die unterschiedliche Erholungszeit der Fermentaktivität in vivo nach Vergiftung mit verschiedenen Alkylphosphaten ist bekannt. Bei Vergiftung mit Parathion (Diäthyl-p-nitrophenylthiophosphat = E 605) oder Paraoxon (Diäthyl-p-

nitrophenylphosphat = E 600) erholt sich die Fermentaktivität in vivo relativ rasch, wobei sicher die körpereigene Fermentneubildung eine wesentliche Rolle spielt. FRIEDBERG und SAKAI (1958) konnten nach mehrtägiger Lagerung von mit Paraoxon und Parathion vergifteten Tierkadavern in den Kleinhirn- und Bluthomogenaten eine sehr viel höhere Esteraseaktivität als unmittelbar nach dem Tode beobachten. Sie bezeichnen diesen Vorgang als *s p o n t a n e* Reaktivierung. Auch bei in-vitro-Versuchen mit Pferdeserum ließ sich das Phänomen der Spontanreaktivierung nach Paraoxon-Vergiftung nachweisen.

Deshalb wiesen FRIEDBERG und SAKAI (1958) darauf hin, daß der Nachweis der Blockierung der Acetylcholinesterase (ACHE) und der Serumpseudocholinesterase (PCHE) in biologischen Substraten ein guter und einfacher Weg ist, um Anhalt für eine E 605-Vergiftung zu bekommen. Auch WIRTH (1956) hat vorgeschlagen, die Diagnose bei fraglichen E 605-Todesfällen durch Aktivitätsmessungen der Cholinesterasen in bestimmten Hirnabschnitten zu unterbauen. Bei acht Suiciden mit E 605 fand er eine deutliche Senkung der Fermentaktivität unter die normalen Werte.

Allerdings weisen FRIEDBERG und SAKAI (1958) in einer Zusammenstellung (von uns gekürzt und ergänzt wiedergegeben) auf eine Reihe von Gesichtspunkten hin, durch welche die Deutung einer Cholinesterasehemmung bei fraglichen Alkylphosphatvergiftungen auf Schwierigkeiten stößt:

1. Die normale Aktivität der ACHE und PCHE unterliegt einer erheblichen Streubreite.
2. Verschiedene Erkrankungen können eine starke Senkung (Leberparenchymerkrankungen), andere eine starke Erhöhung der Pseudocholinesteraseaktivität bewirken.
3. Viele andere Pharmaka hemmen ebenfalls die ACHE und PCHE (Tabellarische Zusammenstellung der Pharmaka bei AUGUSTINSSON 1948).

4. Die Überlebensdauer der ACHE und PCHE ist im Organismus relativ lange, doch der unkontrollierbare postmortale Austausch von Gewebswasser mit Serum und die Hämolyse der Erythrozyten erschweren einen Vergleich der gemessenen Cholinesteraseaktivitäten mit Normalwerten.
5. Die Hemmung der ACHE und PCHE durch manche Phosphorsäureester ist reversibel. Ganz unzulässig ist dabei, auf Grund von Cholinesterasehemmwerten Rückschlüsse auf die Giftkonzentration im untersuchten Gewebe zu ziehen (FRIEDBERG und ERDMANN 1959).
6. Der Vergleich der Ergebnisse wird durch die zahlreichen Methoden zur Aktivitätsmessung der PCHE und ACHE erschwert.
7. Es gibt unterschiedliche Pseudocholinesterasevarianten, z. B. dibucainresistente, fluoridresistente und die "silent gene" Enzymvariante (GOEDDE, DOENICKE und ALT-LAND 1967).

Deshalb empfehlen FRIEDBERG und SAKAI (1958), bei fraglichen Alkylphosphatvergiftungen neben Messung der Cholinesteraseaktivität einen Reaktivierungsversuch mit PAM durchzuführen, da eine Fermentaktivitätssteigerung für das Vorliegen einer Vergiftung des Fermentes mit einem organischen Phosphorsäureester beweisend ist.

Das bisher Bekannte über Wirkungsweise, Vergiftung und Reaktivierung der Acetylcholinesterase stellten LORKE und KIMMERLE (1968) systematisch zusammen. Entsprechendes gilt für die in Blutserum, verschiedenen Geweben und dem Zentralnervensystem vorkommende PCHE.

II. K a s u i s t i k

Anhand zweier E 605-Vergiftungsfälle, einem tödlich und einem nicht tödlich verlaufenden, wurden Spontanreaktivierung und in vitro-Reaktivierung der bei beiden Vergiftungen bis auf eine geringe Restaktivität gehemmten Serum-Pseudocholinesterase (PCHE) bei unterschiedlichen Lagertemperaturen der Seren (Raumtemperatur und Kühlschrank bei 5° C) untersucht. Die Bestimmungen liefen im Fall I bis vier Wochen und im Fall II bis drei Wochen nach Eintritt der Vergiftung. Die PCHE-Aktivität wurde nach der Methode von FRIEDBERG und SAKAI (1958) bestimmt (s. S. 25). Die Maßeinheit der PCHE-Aktivität ist $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min.}$ Reaktiviert wurde in vitro mit PAM (Pyridin-aldoxim-(2)-methjodid) in einer Konzentration von 5×10^{-3} molar (s. S. 38). PAM wurde bei allen Versuchen eine Stunde vor Beginn der Messungen den Seren zugesetzt.

1. Fall I

- a) Anamnese: Am 28. 7. 1967 wurde die Leiche des 18-jährigen G. E. im Anwesen seiner Eltern aufgefunden. Der Tod war am 27. 7. 1967 zwischen 15.00 und 18.00 eingetreten.

Das Gesicht war blaß und wächsern, die Augen geschlossen. Es fanden sich e n g e Pupillen, außerdem blaurote Totenflecken. Der Verdacht auf Vergiftung mit einem Pflanzenschutzmittel ergab sich, weil im Elternhaus E. 605 zum Bespritzen von Bäumen vorrätig war und der noch E. 605 enthaltende Meßbecher nicht wie üblich auf der Giftflasche aufgeschraubt war.

- b) Die wichtigsten Obduktionsbefunde: Ein Hirn- oder Lungenödem lag nicht vor. Pupillen eng! Magenschleimhaut hatte

meerrettichartigen, leicht stehenden Geruch. Es fand sich eine starke Blutstauung aller inneren Organe, rötlicher Schaum in den Luftwegen und ausschließlich flüssiges Leichenblut. Die Befunde wiesen auf einen akuten Todeseintritt hin. Eine natürliche Todesursache konnte nicht gefunden werden.

c) Chemische Untersuchungen:

aa) Im Mageninhalt konnte E-605 nachgewiesen werden.

bb) Blutentnahme vom 28. 7. 1967:

entnommen wurde Herzblut, welches am 31. 7. 1967 im Gerichtsmedizinischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg zur Untersuchung zur Verfügung stand.

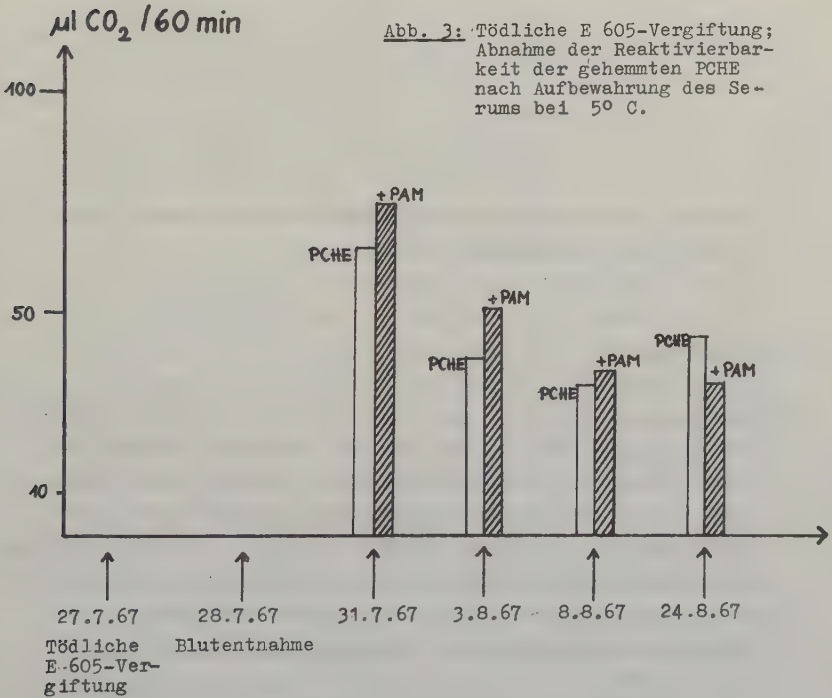
Nach Zentrifugieren des Blutes erhielten wir circa 2,5 ml nicht hämolytisches Serum. Wir bestimmten sofort die PCHE-Aktivität dieses Serums nach der manometrischen Methode von AMMON (1955) mit Hilfe der WARBURG-Apparatur (s. S.25). Die PCHE erwies sich als stark gehemmt, dennoch bestand eine Restaktivität von 65 $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$. Eine in vitro-Reaktivierung mit PAM auf Werte um 75 $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$ konnte erreicht werden (s. Abb. 3). Ein Teil des Serums wurde ab jetzt im Kühlschrank bei 5°C, der restliche Teil bei Raumtemperatur aufbewahrt. In den folgenden Tagen führten wir mit beiden Seren sowohl Messungen der PCHE-Aktivität als auch der Reaktivierbarkeit mit PAM durch. Das Serum wurde 1 Stunde vor Beginn der Messung mit einer PAM-Konzentration von 5×10^{-3} molar reaktiviert.

d) Ergebnisse: (s. Abb. 3)

aa) Bereits 5 Tage nach der Blutentnahme vom 28. 7. 67 war das bei Raumtemperatur aufbewahrte Serum mit PAM nicht mehr zu reaktivieren. Die Cholinesteraseaktivität lag bei 45 $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$. Nach Zugabe

Tabelle I: E 605-Vergiftung - Fall I

1	Tage nach Vergiftung	4	5	7	12	28
2	PCHE-Aktivität des Serums (5° C) in $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$	65		40	35	45
3	+ PAM 5×10^{-3} molar	75		51	37	35
4	PCHE-Aktivität des Serums (Raumtemperatur in $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$	65	43			45
5	+ PAM 5×10^{-3} molar	75	45			35



von PAM erhielten wir einen Wert von $43 \mu\text{lCO}_2/60 \text{ min.}$ Dagegen konnte das bei 5°C gelagerte Serum noch am 7. Tag nach der Blutentnahme mit der gleichen PAM-Konzentration recht deutlich reaktiviert werden. Allerdings konnte am 12. Tag eine Reaktivierung des vergifteten Serums nicht mehr nachgewiesen werden. (s. Abb. 3).

4 Wochen nach der Blutentnahme fand durch Zugabe von PAM in vitro eine deutliche Hemmung der PCHE-Aktivität beider Seren (Raumtemperatur und Kühlschrank) statt.

Eine Spontanreaktivierung der Serumpseudocholinesterase konnte bei dieser tödlichen E 605-Vergiftung nicht beobachtet werden. Sowohl bei Aufbewahrung des Serums im Kühlschrank als auch bei Raumtemperatur wurde ein geringer Abfall der PCHE-Aktivität von zunächst $65 \mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$ auf Werte um $40 \mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$ innerhalb eines Zeitraums von 28 Tagen festgestellt.

Weitere Messungen konnten wegen der zu geringen Serummenge nicht durchgeführt werden.

2. Fall II

- a) Anamnese: K. St. hat am 30. 8. 1967 in suicidalen Absicht aus einer halbvollen Flasche mit E 605 die Hälfte in ein Limonadenglas geschüttet und zwei Schluck daraus getrunken. Wegen des bitteren Geschmacks verwarf K. St. das Gift. Nach einer Stunde traten Übelkeit, Schweißausbrüche und mehrmaliges Erbrechen auf. Daraufhin wurde der Hausarzt gerufen, der die Einweisung des Patienten in die toxikologische Abteilung der Nürnberger Krankenanstalten veranlaßte.
- b) Bei klinischer Untersuchung fand sich außer subikterischen Skleren kein wesentlicher pathologischer Befund.

- c) Nach sofortiger Blutentnahme wurde der Patient mit Atropin und 500 mg Toxogonin i.v. behandelt. 30 Minuten nach intravenöser Gabe dieser Medikamente erfolgte eine weitere Blutentnahme. Zusätzliche therapeutische Maßnahmen bestanden in Magenspülungen und Verabreichung von Tierkohle.
- Am 8. 9. 1967 konnte K. St. beschwerdefrei nach Hause entlassen werden.

d) Chemische Untersuchungen:

- aa) In der Magenspülflüssigkeit konnte E 605 **n i c h t** nachgewiesen werden.
- bb) In einigen der nach ELLIOT und Mitarbeitern aufgearbeiteten Harnproben konnte p-Nitrophenol in Mengen zwischen 50 und 150 ~~8~~% nachgewiesen werden. Dies sprach für die Einnahme eines Alkylphosphates mit p-Nitrophenol als Acylrest. Ob es sich allerdings um Methyl- oder Äthyl-E 605 gehandelt hat, ließ sich nach dieser Methode nicht bestimmen.
- cc) Aus den beiden Blutentnahmen (30.8.67 - 18.15 Uhr, vor, und 19.15 Uhr, nach Verabreichung von Atropin und Toxogonin) konnten wir mittels Zentrifugieren circa je 5 ml Serum gewinnen. Die Hälfte des Serums der Blutentnahme vor Behandlungsbeginn wurde bei Raumtemperatur (Serum I a), die andere Hälfte im Kühlschrank bei 5° C (Serum I b) gelagert. Das Serum aus der Blutentnahme nach Behandlung mit Atropin und Toxogonin wurde ebenfalls im Kühlschrank aufbewahrt (Serum II).
- Von sämtlichen Seren bestimmten wir im weiteren Verlauf fast täglich die Pseudocholinesteraseaktivität sowie die in vitro-Reaktivierbarkeit der PCHE mit PAM, das in einer Konzentration von 5×10^{-3} molar jeweils eine Stunde vor Beginn der Messungen den mit E 600-vergifteten Seren zugesetzt wurde.
- dd) Ergebnisse: (s. Tab. II, Abb. 4 und Abb. 5)
1. Die PCHE-Aktivität im Serum des Vergifteten war

Tabelle: II. E 605-Vergiftungsfall II. Aktivität und Reaktivierbarkeit der Pseudocholinesterase der Seren Ia, Ib und II bei Messungen bis zu 15 Tagen nach Vergiftung.

1 Tage nach Vergiftung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	15
2 PCHE-Aktivität des Serum Ia	20		21	30		36		38			
3 PCHE-Aktivität des Serum Ia nach Zugabe v. PAM 5×10^{-3} molar	104		70	73		52		41			
4 PCHE-Aktivität des Serum Ib	20	23		20	24	17	28		31	32	32
5 PCHE-Aktivität des Serum Ib nach Zugabe v. PAM 5×10^{-3} molar	104	106		92	89	83	92		90	89	85
5 PCHE-Aktivität des Serum II	120	131	120		124						
7 PCHE-Aktivität des Serum II nach Zugabe v. PAM 5×10^{-3} molar	103	120	112		103						

Serum Ia: Serum, das aus der Blutentnahme vor Atropin- und Toxogoninbehandlung gewonnen und bei Raumtemperatur gelagert wurde.

Serum Ib: Serum, das aus der Blutentnahme vor Atropin- und Toxogoninbehandlung gewonnen und im Kühlschrank gelagert wurde.

Serum II: Serum, gewonnen aus der Blutentnahme 30 min nach Behandlung mit Atropin und Toxogonin, aufbewahrt im Kühlschrank.

Abb. 4: Zunahme der Spontanreaktivation und Abnahme der Reaktivierbarkeit der PCHE durch PAM bei Serum I b (5°C)

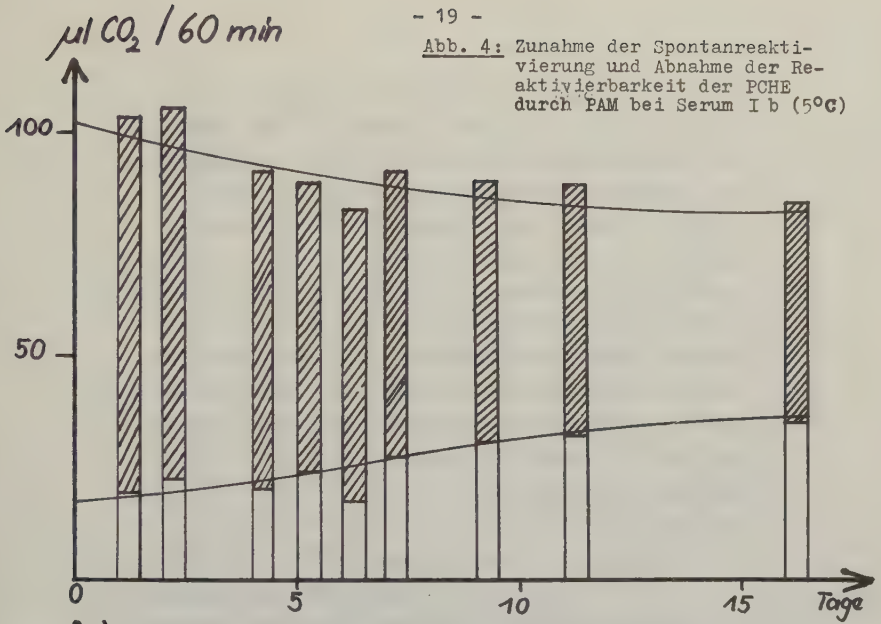
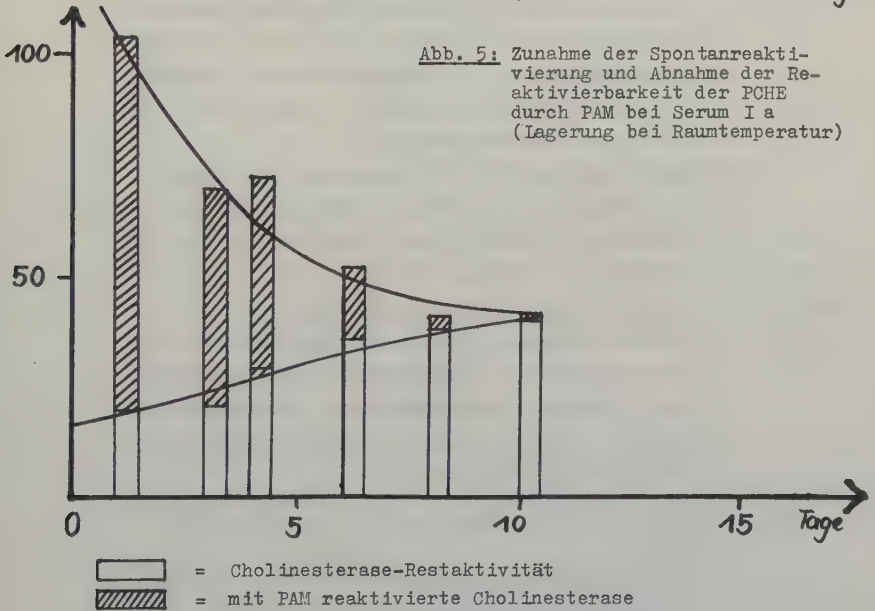


Abb. 5: Zunahme der Spontanreaktivation und Abnahme der Reaktivierbarkeit der PCHE durch PAM bei Serum I a (Lagerung bei Raumtemperatur)



mit 20 $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$ bis auf eine gewisse Restaktivität stark gehemmt, ließ sich aber mit PAM auf Werte bis zu 106 $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$ reaktivieren.

2. Die PCHE-Aktivität des Serum II lag mit 120 $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$ im Normbereich. Hier konnte durch PAM keine Reaktivierung sondern - im Gegenteil - eine Hemmung der PCHE auf 86 % der ursprünglichen Aktivität erreicht werden.

Bei täglichen Messungen zeigte sich keine Änderung der PCHE-Aktivität, sodaß wir nach 5 Tagen mit Serum II keine weiteren Messungen mehr anstellten (s. Tab. II/ Spalte 6 und 7).

3. Ergebnisse Serum I a (s. Abb. 5 - Tab. II/Spalte 2 und 3):

aa) Spontanreaktivierung: Das Serum I a zeigte bei wiederholten Messungen einen Anstieg der PCHE-Aktivität von 20 auf 38 $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$ im Verlauf von 10 Tagen. Dies wird als Spontanreaktivierung bezeichnet. Ab 10. Tag konnte ein weiteres Ansteigen der PCHE-Aktivität nicht beobachtet werden.

- bb) Reaktivierbarkeit: Gleichzeitig war eine starke Abnahme der Reaktivierbarkeit des vergifteten Serum I a bei Messungen in den ersten Tagen festzustellen (s. Abb. 5).

Bereits acht Tage nach Blutentnahme war mit der üblichen PAM-Konzentration von 5×10^{-3} molar eine signifikante Reaktivierung nicht nachweisbar. Dieselben Aktivitätsverhältnisse zeigten sich bei Messungen an den darauffolgenden Tagen.

4. Ergebnisse Serum I b (s. Abb. 4, Tab. II/Spalte 4 und 5):

aa) Spontanreaktivierung: Bei Serum I b stieg die PCHE-Aktivität im Verlauf der ersten 15 Tage bei fast täglichen Messungen von 20 $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$

kontinuierlich auf 32 $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$ an. Über die Möglichkeit einer weiteren Spontanreaktivierung nach dem 15. Tag konnte wegen der begrenzt zur Verfügung stehenden Serummengen keine Aussage gemacht werden.

- bb) Reaktivierbarkeit: Die gehemmte PCHE des Serum I b ließ sich ebenfalls mit der üblichen PAM-Konzentration fast bis auf Normalwerte reaktivieren (S.19 , Abb. 4-schraffierter Bereich).

Im Verlauf von 15 Tagen konnte eine nur geringe Abnahme der Reaktivierbarkeit bei Serum I b gezeigt werden. Die PCHE war noch am 15. Tag nach Vergiftung bis auf Werte um 85 $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$ reaktivierbar.

5. Vergleich der Seren I a und I b:

- aa) Spontanreaktivierung: Die beobachtete Spontanreaktivierung verläuft bei Serum I b (Kühlschrank 5°C) protrahierter als bei Serum I a. Während hier bereits nach 10 Tagen eine "S ä t t i g u n g" erreicht ist, zeigt die PCHE-Aktivität bei Serum I b noch nach 15 Tagen leicht ansteigende Tendenz.

- bb) Reaktivierbarkeit: Während bei Serum I a bereits ab 8. Tag mit PAM keine Reaktivierung mehr zu erzielen war, zeigte Serum I b noch am 15. Tag nach Lagerung bei 5°C deutliche Reaktivierbarkeit. Den zeitlichen Unterschied in der Abnahme der Reaktivierbarkeit der Seren I a und I b zeigt anschaulich ein Vergleich der Abbildungen 4 und 5.

3. Bei drei weiteren tödlichen E 605-Vergiftungsfällen, die zwischen 1 und 3 Jahren zurücklagen, wurde aus im Kühlraum (ca. -10°C) gelagerten geringen Serummengen die Pseudocholinesteraseaktivität nach der Methode von FRIEDBERG und SAKAI bestimmt. Es konnte in allen drei Fällen eine geringe Restaktivität der PCHE nachgewiesen werden. Die Werte lagen zwischen 15 und 40 $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$. Der Versuch einer in vitro-Reaktivierung mit PAM blieb in allen Fällen erfolglos.

III. Problemstellung

Für Vergiftungen mit Alkylphosphaten wurden auf der Grundlage eines fermentreaktivierenden Antidots (PAM = Pyridinaldoxim-(2)-methjodid) spezifische Nachweismethoden hinsichtlich ihrer Anwendungsmöglichkeit für die Praxis untersucht. Als Fermentsubstrate wurden Blut und Hirngewebe verwendet (FRIEDBERG und SAKAI 1958).

Die Vergiftung der Fermentpräparate wurde mit E 600, E 605 und Systox in einer Konzentration von 3×10^{-5} und 3×10^{-6} für E 600 sowie 10^{-5} und 10^{-6} molar für Systox durchgeführt. Diese hohen Konzentrationen werden allerdings, wie angegeben wird, in vivo praktisch nicht erreicht. Versuche mit E 605 eigneten sich nicht für in vitro-Untersuchungen, da E 605 nach oraler Aufnahme erst durch Konversion in der Leber in den eigentlich wirksamen Cholinesteraseblocker E 600 umgewandelt wird.

Die zur Reaktivierung der vergifteten Fermentpräparate günstige PAM-Konzentration, bei der optimale Reaktivierung des vergifteten und geringgradige Hemmung des unvergifteten Fermentes gegeben war, haben FRIEDBERG und SAKAI (1958) mit 10^{-3} molar angegeben. Bei ihren Untersuchungen verwendeten die Autoren folgende Fermentpräparate:

Meerschweinchenplasma, -blut, -erythrozyten, -gesamthirn, -kleinhirn und Katzenhirn.

Für Untersuchungen, in denen die mögliche Reaktivierungsdauer der blockierten Fermente durch PAM und damit der

zeitlich mögliche Nachweis einer Alkylphosphatvergiftung bestimmt würde, verwendete man Pferdeserum, das bei Kühlschrank- und Raumtemperatur aufbewahrt wurde. Schließlich untersuchte man noch Blut und Kleinhirn von akut und

protrahiert vergifteten Tieren (meist Meerschweinchen) nach unterschiedlicher postmortaler Lagerungszeit bei Raum- und Kühlschranktemperatur.

In einer Tabelle mit Angaben über 21 Untersuchungen an 12 Todesfällen (davon 7 Suicidfälle mit E-605), bei denen die Cholinesteraseaktivität im Blut und in Gehirnabschnitten mit und ohne PAM gemessen wurde, konnte die Brauchbarkeit dieses Verfahrens für die Praxis gezeigt werden.

Bei Untersuchungen über die spontane Reaktivierung der durch Alkylphosphate blockierten Cholinesterase von Pferdeserum arbeiteten FRIEDBERG und ERDMANN (1959) mit folgenden Vergiftungskonzentrationen:

E-600	:	1×10^{-5} molar bis 5×10^{-7} molar
Systox	:	1×10^{-5} molar bis 2×10^{-8} molar
Iso-Systox	:	5×10^{-6} molar bis 1×10^{-7} molar

Die Tatsache, daß in den bisherigen Versuchen über Hemmung und Reaktivierung der Serumpseudocholinesterase fast ausschließlich mit Tierseren bzw. Tiergewebe gearbeitet wurde, bewog uns zur Durchführung von in-vitro-Untersuchungen über die Hemmung und Reaktivierung der menschlichen Serumpseudocholinesterase.

Bei den von uns untersuchten E 605-Vergiftungsfällen (s. Kasuistik S. 13 bis 21) konnten wir beobachten, daß

1. sowohl bei einer tödlichen als auch bei einer nicht tödlichen E 605-Vergiftung eine gewisse Restaktivität der menschlichen Serumpseudocholinesterase vorlag,
2. im Vergiftungsfall II die Spontanreaktivierung der gehemmten PCHE bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen des vergifteten Serums unterschiedlich

rasch verlief,

3. die Reaktivierungsmöglichkeit der blockierten PCHE mit PAM bei verschiedenen Lagerungstemperaturen der vergifteten menschlichen Seren zeitlich unterschiedlich begrenzt war.

Auf Grund dieser Beobachtungen wollten wir durch unsere in-vitro-Versuche mit 9 menschlichen Seren darüber Aufschluß gewinnen, wie sich die menschliche Serumpseudocholinesterase nach Hemmung mit E 600 bis auf eine gewisse Reaktivität, hinsichtlich Spontanreaktivierung und Reaktivierbarkeit mit PAM in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur der vergifteten Seren verhält.

IV. Experimenteller Teil

1. Untersuchungsmethodik

a) Serumgewinnung

Gesunden nüchternen Versuchspersonen zwischen 18 und 30 Jahren wurden ca. 70 bis 100 ml Cubitalvenenblut steril entnommen. Durch Zentrifugieren erhielten wir pro Versuchsperson ca. 20 bis 30 ml nicht hämolytisches Serum. Da Reihenversuche mit Aufbewahrung der Seren bei Raumtemperatur und 50 °C im Kühlschrank durchzuführen waren, wurde das je Versuchsperson gewonnene Serum zunächst in eine größere Portion, ca. 2/3, und eine kleinere Portion, ca. 1/3, aufgeteilt. Die größere Menge wurde nach der später genau beschriebenen Methode (s.S.27) mit E 600 vergiftet und zu gleichen Teilen auf zwei Reagenzgläser verteilt. Ebenso wurde das verbleibende unvergiftete Serum in zwei gleiche Portionen aufgeteilt. Man erhält somit 4 Serumansätze je Versuchsperson:

Normalserum	-	Raumtemperatur
Normalserum	-	Kühlschrank (50 °C)
Vergiftetes Serum	-	Raumtemperatur
Vergiftetes Serum	-	Kühlschrank (50 °C)

Sämtliche Reagenzgläser mit den Versuchsseren wurden sofort verschlossen und bis zur Vorbereitung für den ersten Versuch, der bei allen Untersuchungen ca. 4 - 6 Stunden nach Blutentnahme durchgeführt wurde, im Kühlschrank aufbewahrt.

b) Durchführung der Versuche

Zur Bestimmung der Pseudocholinesteraseaktivität der unvergifteten, vergifteten, sowie vergifteten und mit PAM reaktivierten Seren verwendeten wir die manometrische Methode von AMMON, die von FRIEDBERG und SAKAI sowie von uns abgewandelt wurde. Die Messungen wurden mit Hilfe der WARBURG-Apparatur durchgeführt.

Das Prinzip dieser enzymatischen Fermentbestimmung liegt in der manometrischen Messung des CO_2 -Druckes, der durch Freiwerden von CO_2 -Gas aus gelöstem Natriumbicarbonat entsteht, wenn vorhandenes Acetylcholin durch die im Serum vorhandene Pseudocholinesterase in Cholin und Essigsäure gespalten wird, wobei eine Verschiebung des folgenden chemischen Gleichgewichtes nach rechts erfolgt:



Vor jedem Versuch wurden 6 Serumansätze zu je 1,5 ml 1:10 verdünnten Serums hergestellt. Wir verwendeten dafür 0,15 ml unvergifteten oder vergiftetes bzw. vergiftetes und mit PAM reaktiviertes Serum, das mit 1,35 ml einer Verdünnungslösung versetzt wurde. Die Verdünnungslösung bestand aus einem Gemisch einer 0,9 %igen Kochsalzlösung (10 Teile) und einer 1,26 %igen Natriumbicarbonatlösung (3 Teile) und wurde alle zwei Wochen frisch hergestellt.

Wir erhielten somit im Prinzip für jede Versuchsreihe folgende Serumansätze:

1. 1,5 ml 1:10 verdünntes unvergiftetes Serum, gelagert bei Raumtemperatur
2. 1,5 ml 1:10 verdünntes unvergiftetes Serum, gelagert bei 5° C (Kühlschrank)
3. 1,5 ml 1:10 verdünntes, mit E 600 vergiftetes Serum, gelagert bei Raumtemperatur
4. 1,5 ml 1:10 verdünntes, mit E 600 vergiftetes Serum, gelagert bei 5° C (Kühlschrank)
5. 1,5 ml 1:10 verdünntes, mit E 600 vergiftetes und mit PAM reaktiviertes Serum, gelagert bei Raumtemperatur
6. 1,5 ml 1:10 verdünntes, mit E 600 vergiftetes und mit PAM reaktiviertes Serum, gelagert bei 5° C (Kühlschrank)

Je 0,5 ml des mit der Verdünnungslösung 1 : 10 verdünnten Serums wurde in die Anhangsbirne und 1,5 ml einer 0,5%igen Acetylcholinchloridlösung (hergestellt alle 2 - 3 Tage durch Lösen von Reinsubstanz in destilliertem Wasser) in die Haupträume der Kölbchen pipettiert. Die Kölbchen befestigten wir daraufhin nach vorherigem Einfetten der Glasschliffe an den Manometern und brachten das Manometer-Gefäßsystem in das Wasserbad der WARBURG-Apparatur. Die Temperatur des Wasserbades wurde durch einen Thermostaten konstant auf 37° C gehalten. Anschließend wurden die Flüssigkeitgemische in den Kölbchen (Haupträume und Anhangsbirnen) über ein Schlauchsystem unter Schütteln des Gerätes (Frequenz 100/min) 30 Minuten mit einem Gasgemisch aus 5 % CO₂ und 95 % N₂ bei noch offenem System begast. Zur Vermeidung von Meßungenauigkeiten mußten bei Versuchsbeginn Gas und Flüssigkeiten des Manometergefäßsystems die konstante Temperatur von 37° C aufweisen. Der durch das Begasen entstandene leichte Temperaturabfall mußte demzufolge ausgeglichen werden. Dies wurde durch fünfminütiges Offenlassen des Manometergefäßsystems im Anschluß an den Begasungsvorgang erreicht. Durch Kippen des Manometergefäßsystems mischten wir nun das in den Anhangsbirnen enthaltene Serum mit der Acetylcholinchloridlösung in den Haupträumen der Kölbchen. Nach dreiminütigem erneutem Schütteln verschlossen wir das Manometergefäßsystem. Anschließend wurde im Verlauf einer Stunde in viertelstündlichem Intervall jedes Manometer abgelesen.

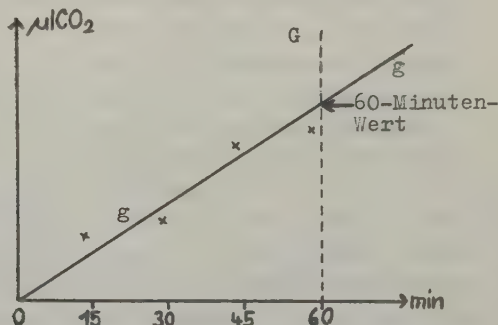
Für jede Versuchsreihe standen 14 Manometergefäßsysteme zur Verfügung. Von jedem Serumansatz (1,5 ml 1:10 verdünntes Serum) führten wir für alle Versuche Doppelmessungen durch. Zur Kontrolle liefen je Versuch zwei Leerwerte mit, bei denen die Anhangsbirne 0,5 ml der verwendeten Verdünnungslösung enthielt, sodaß dadurch die Eigenhydrolyse des Acetylcholinchlorids bestimmt und bei Auswertung

der Meßergebnisse entsprechend berücksichtigt werden konnte.

c) Auswertung der Versuchsergebnisse

Da wir Doppelmessungen durchführten und in viertelstündlichen Abständen den Manometerstand im Verlauf einer Stunde abgelesen haben, erhielten wir pro Serumansatz 8 Meßwerte. Nach FRIEDBERG und SAKAI liegen die gefundenen Meßpunkte im Idealfall auf einer Geraden g , die durch den Nullpunkt verläuft, wenn auf der Abszisse eines Koordinatensystems die Zeit in Minuten und auf der Ordinate die gemessene Menge CO_2 in μlCO_2 aufgetragen wird (s. Abb. 6)

Abb. 6: Skizze zur Auswertung der Meßergebnisse



Wie RABAST (Dissertation 1970, III, 1 c, S. 17-18) zeigen konnte, nimmt die Meßgenauigkeit der WARBURG-Apparatur bei hohen Meßwerten ab. Um nun den für unsere Versuche als Meßgröße der PCHE-Aktivität festgelegten 60-Minuten-Wert ($\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$) möglichst genau zu erhalten, gingen wir folgendermaßen vor:

Die bei jeder Bestimmung der PCHE-Aktivität entstandene Menge an CO_2 -Gas wurde so ermittelt, daß der mit Hilfe des Manometers gemessene Druck $p\text{CO}_2$ mit einer jedem Manometergefäßsystem zugeordneten Konstanten ¹⁾ multipliziert wurde.

1) Berechnung der Konstanten in: H. Süllmann, Manometrische Methoden zur Untersuchung des Gewebsstoffwechsels, Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse; herausgegeben von K. Lang und E. Lehnartz, Band VI A, Teil A, Springer Verlag Berlin 1964

Die Dimension der PCHE-Aktivität ist $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min.}$

Zur Ermittlung des 60-Minuten-Wertes wurden aus den jeweils beiden 15-Minuten-, 30-Minuten-, 45-Minuten- und 60-Minuten-Werten Mittelwerte gebildet, von denen die entsprechenden Mittelwerte der Leerwerte subtrahiert wurden. Wir erhielten somit 4 Meßpunkte, die in ein Koordinatensystem eingetragen wurden (s. Abb. 6).

Durch diese 4 Punkte legten wir eine durch den Nullpunkt verlaufende Gerade g, deren Schnittpunkt mit einer zur Ordinate parallelen Geraden G den 60-Minuten-Wert markiert. Für sämtliche Messungen wurde der 60-Minuten-Wert als Meßgröße der PCHE-Aktivität in der oben genannten Weise ermittelt.

An dieser Stelle soll nochmals darauf hingewiesen werden, daß bei jedem Versuch sowohl Normalseren, als auch vergiftete, sowie vergiftete und mit PAM reaktivierte Seren gleichzeitig untersucht wurden und die zur Herstellung der nötigen Serumansätze notwendigen Arbeitsvorgänge parallel zueinander ausgeführt wurden. Nur der besseren Übersicht halber werden die einzelnen Schritte der Arbeitswege und die Ergebnisse der Messungen in den nun folgenden Punkten 2 - 4, Teil IV, getrennt dargestellt.

Cholinesteraseaktivitäten der unvergifteten Seren

- a) Herstellung der Serumansätze: Spätestens 4 - 6 Stunden nach Blutentnahme bei den Versuchspersonen wurde die Messung der PCHE-Aktivität des jeweiligen Serums vorgenommen (Normalaktivität). 0,15 ml unvergiftetes Serum wurden mit 1,35 ml Verdünnungslösung 1 : 10 verdünnt. Von diesem Serumansatz pipettierten wir je 0,5 ml in die Anhangsbirnen zweier Kölbchen und

fürhten den unter IV/1 b) beschriebenen Versuch durch.

b) Cholinesteraseaktivität bei sofortiger Messung:

Wie bekannt, zeigten die PCHE-Aktivitäten der unvergifteten Seren verschiedener Versuchspersonen eine erhebliche Streubreite. Die Werte lagen zwischen 145 und 217 $\mu\text{lCO}_2/60 \text{ min}$ (Tab.III/Sp.3).

c) Die PCHE-Aktivität nach Lagerung der Seren bei Raumtemperatur: Bei wiederholten Messungen der PCHE-Aktivitäten nach Lagerung der Seren bei Raumtemperatur zeigte sich eine gewisse Schwankungsbreite der Meßwerte, die im Höchstfall bei +24 μlCO_2 (Serum 3) und -24 μlCO_2 (Serum 4) im Vergleich zur sofort gemessenen Aktivität lagen. Eine bessere Aussage über die Schwankungsbreite bietet die Angabe der Abweichungen in Prozenten der unter 2 b) gemessenen Normalaktivitäten. Hier waren die größten Abweichungen mit +15,2 % (Serum 5) und -11,5 % (Serum 4) festzustellen. Bei allen übrigen Seren war die Schwankungsbreite geringer.

Wie RABAST (Dissertation 1970) in Teil III, 1 c, zeigen konnte, muß die durch Meßungenauigkeiten der WARBURG-Apparatur und andere Fehlerquellen bedingte Fehlerbreite bei hohen Meßwerten mit 15 % angenommen werden. Die maximale Schwankungsbreite bei unseren Messungen liegt also noch im Bereich der Meßungenauigkeit. Eine eindeutige Aktivitätszu- oder Abnahme der PCHE konnte bei keinem der Seren selbst nach Lagerung bis zu 90 Tagen nach Blutentnahme beobachtet werden.

d) Die PCHE-Aktivität nach Lagerung der unvergifteten Seren bei 5° C: Auch hier lag die Schwankungsbreite der Normalaktivitäten der PCHE mit maximal -10,5 % und +17,2 % noch im Bereich der Meßungenauigkeit.

Ein eindeutiges Ansteigen oder Absinken der PCHE-Aktivität nach längerer Lagerungsdauer (bis zu 90 Tagen) konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Die Cholinesteraseaktivität lag bei späteren Messungen oftmals höher oder tiefer als bei Beginn der Messungen.

- e) Ergebnisse bei Untersuchung der PCHE-Aktivitäten unvergifteter Seren: Bei wiederholten Aktivitätsbestimmungen nach Lagerung der unvergifteten Seren über einen längeren Zeitraum konnte unabhängig von der Lagerungstemperatur (Raumtemperatur und 5° C) weder eine Aktivitätszu- noch Aktivitätsabnahme der PCHE beobachtet werden. Die Schwankungsbreite liegt im Bereich der Meßgenauigkeit.

3. Vergiftung der Seren 1 - 9 mit E 600

Unseren Untersuchungen lag die Beobachtung zugrunde, daß bei nahezu allen E 605-Vergiftungsfällen die menschliche Serumpseudocholinesterase nicht vollständig blockiert war, sondern immer eine gewisse Restaktivität aufwies. Wir versuchten daher bei unseren in-vitro-Versuchsreihen mit menschlichen Seren eine E 600-Vergiftungskonzentration zu finden, die bei allen Seren eine Restaktivität der Cholinesterase bis maximal 30 % der Normalaktivität gewährleistete.

NORMALAKTIVITÄT

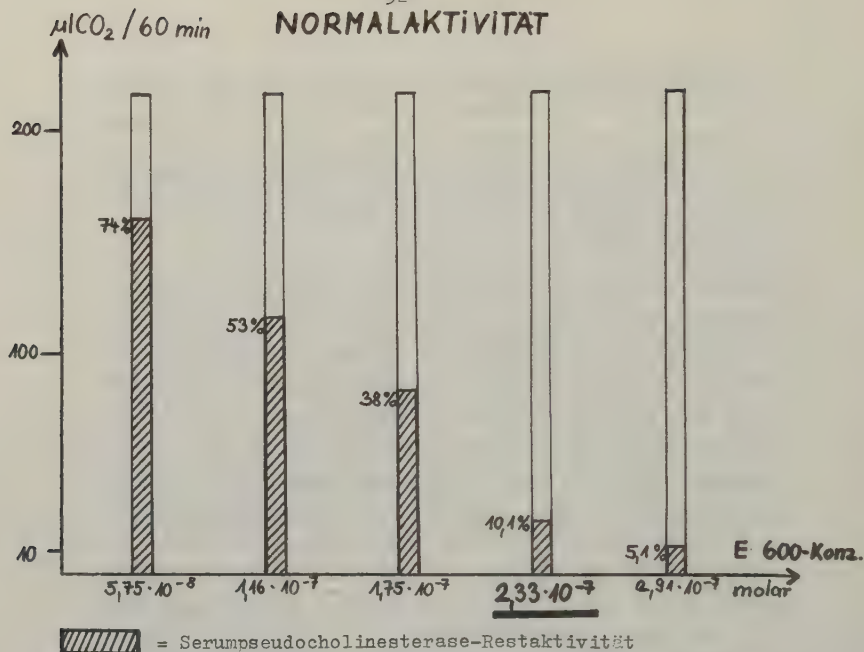


Abb. 8: Zunehmende Hemmung der PCHE eines Normalserums bei Vergiftung mit steigenden E 600-Konzentrationen

- a) Bestimmung einer für unsere in-vitro-Versuche geeigneten E-600-Vergiftungs-Konzentration: Zur Vergiftung verwendeten wir den Phosphorsäureester Paraoxon = E-600 = 0,0-Diäthyl-O-(p-Nitrophenyl)-Phosphat. Zunächst wurde eine $4,6 \times 10^{-6}$ molare E-600-Lösung hergestellt, indem 1 mm^3 ölige Reinsubstanz in 10 ml der oben angegebenen Verdünnungslösung gelöst, und diese Lösung nochmals 1:100 verdünnt wurde. Von der $4,6 \times 10^{-6}$ molaren E-600-Giftlösung wurden jetzt unterschiedliche Mengen zu je 0,15 ml unverdünnten Serums einer Versuchsperson gegeben. So erhielten wir 5 Serumansätze mit unterschiedlichen E-600-Vergiftungskonzentrationen.

Serumansätze:

Serum	+	Giftlösung	-->	E-600-Konz.i.unverg.Serum
0,15 ml	+	2 mm ³	-->	5,75 x 10 ⁻⁸ molar
0,15 ml	+	4 mm ³	-->	1,16 x 10 ⁻⁷ molar
0,15 ml	+	6 mm ³	-->	1,75 x 10 ⁻⁷ molar
0,15 ml	+	8 mm ³	-->	2,33 x 10 ⁻⁷ molar
0,15 ml	+	10 mm ³	-->	2,91 x 10 ⁻⁷ molar

Unmittelbar im Anschluß an die Vergiftung wurden die Seren mit 1,35 ml Verdünnungslösung verdünnt und die Bestimmung der Cholinesteraseaktivität mit der WARBURG-Apparatur nach der unter IV/1 b) beschriebenen Weise durchgeführt.

Ergebnis: (Abb. 8)

Bei zunehmender Giftkonzentration fand sich eine kontinuierliche Abnahme der PCHE-Aktivität. Bei der $2,33 \times 10^{-7}$ molaren E-600-Konzentration lag die Aktivitätshemmung der PCHE bei 10,1 % der Normalaktivität. Damit war unsere Forderung, bei Vergiftung der Seren eine 30 % nicht übersteigende Restaktivität zu erhalten, zunächst erfüllt. Wir verwendeten daher zur Vergiftung der Seren 1 - 9 einheitlich eine E-600-Konzentration von $2,33 \times 10^{-7}$ molar, nicht zuletzt um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

- b) Methodik der Vergiftung der Seren 1 - 9: Zur Vergiftung mit E-600 standen bei jeder der neun Versuchspersonen circa 10 - 15 ml Serum zur Verfügung. Wir bezeichnen diese Menge mit A_n , wobei $n = \text{Serum } 1 \dots 9$. Damit in allen Seren nach Vergiftung die gleiche E-600-Konzentration von $2,33 \times 10^{-7}$ molar vorlag, mußten wir folgendermaßen vorgehen: Wie unter IV/3 a) beschrieben, wurde bei Zugabe von 8 mm³ der $4,6 \times 10^{-6}$ molaren E-600-Giftlösung zu 0,15 ml Serum

eine $2,33 \times 10^{-7}$ molare Vergiftungskonzentration erreicht. Für die zu vergiftende jeweilige Serummenge A_n (ml) benötigte Menge Giftlösung G_n errechnet sich demnach:

$$G_n \text{ (mm}^3\text{)} = \frac{A_n}{0,15} \cdot 8 \text{ (mm}^3\text{)}$$

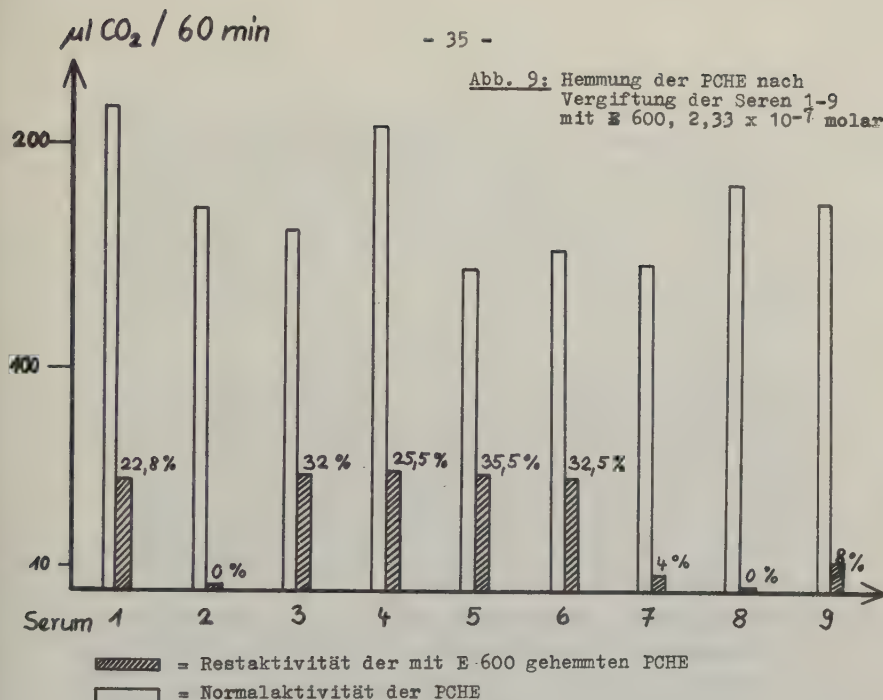
2 - 3 Stunden nach Blutentnahme wurde die jeweils zur Vergiftung mit E 600 zur Verfügung stehende Serummenge A_n mit einer Giftmenge G_n (mm³) vergiftet, sodaß die entgültige E-600-Konzentration von $2,33 \times 10^{-7}$ molar im unverdünnten Serum vorlag. Die Hälfte der so vergifteten Serummenge wurde ab sofort bei Raumtemperatur, die andere Hälfte bei Kühlschranktemperatur (5° C) gelagert.

Die Inkubationszeit des Giftes bei Raumtemperatur bis zur ersten Aktivitätsmessung der gehemmten PCHE betrug circa 2 - 3 Stunden.

In den nächsten 8 - 10 Tagen erfolgten tägliche, ab 10. Tag alle 2 - 3 Tage Aktivitätsbestimmungen der PCHE sowohl der bei Raumtemperatur als auch der bei 5° C gelagerten vergifteten Seren.

c) V Versuchsergebnisse nach Vergiftung der Seren 1 - 9 mit E-600 $2,33 \times 10^{-7}$ molar:

Zunächst konnten wir eine unterschiedliche Hemmung der Serumpseudocholinesterase in den einzelnen Seren feststellen. Im Verlauf der weiteren Untersuchungen wurde eine Zunahme der Cholinesteraseaktivität in den ersten Tagen beobachtet. Der Vorgang wird als **S p o n t a n - r e a k t i v i e r u n g** bezeichnet.



1. Hemmung der PCHE mit E 600: Die Cholinesterase der 4 - 6 Stunden nach Blutentnahme untersuchten Seren wurde durch E-600, das in einer $2,33 \times 10^{-7}$ molaren Konzentration bei einer Inkubationszeit von 1 - 2 Stunden vorlag, bereits erheblich gehemmt. Die PCHE-Aktivitäten lagen zwischen 0 und 35 % der Normalaktivitäten der jeweiligen unvergifteten Seren (Abb. 9 und 12). Bei 2 Seren war bei dieser relativ geringen Giftkonzentration schon eine vollständige Blockierung der Fermentaktivität eingetreten. Bei den übrigen 7 Seren lag die unterschiedlich hohe Restaktivität zwischen 4 % und 35 % (Abb. 9). Eine Beziehung zwischen Höhe der Normalaktivität und Vergiftbarkeit der einzelnen Seren konnte nicht

gefunden werden.

Nach GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (1969) kann die Vergiftbarkeit der menschlichen Serumpseudocholinesterase mit E 600 in geeigneter Konzentration in Gruppen mit niedriger (0 - 5 %), mittlerer (13 - 20 %) und hoher (29 - 48 %) Restaktivität eingeteilt werden.

2. Spontanreaktivierung: Bereits beim E-605-Vergiftungsfall II (s. Kasuistik.) konnten wir die unterschiedliche Spontanreaktivierung des vergifteten Serums bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen beobachten. Auch bei unseren in-vitro-Versuchen war eine, von der Lagerungstemperatur abhängige, unterschiedliche Spontanreaktivierung der vergifteten Seren zu beobachten.

- a) Spontanreaktivierung der Seren 1 - 9 nach Aufbewahrung bei Raumtemperatur: (Ergebnisse s.Tab.III Spalte 2 -56; Abb. 10, gestrichelte Kurven): Bei täglichen Aktivitätsbestimmungen der vergifteten Seren innerhalb der ersten 8 Tage konnte eine überraschend starke spontane Zunahme der Aktivitäten in den einzelnen Seren festgestellt werden. Während sofort nach Vergiftung die Hemmung derPCHE zwischen 0 und 35 % der jeweiligen Normalaktivität lag, betrug nach einer Lagerungsdauer von 5 - 7 Tagen die PCHE-Aktivität bereits 18 - 44 % (s.Tab.V). Die Aktivitätszunahme lag für alle Seren zwischen 9 und 19 %, im statistischen Mittel bei 15 %. Ab 10. Tag der Beobachtung erfolgte praktisch keine Aktivitätszunahme. Die Spontanreaktivierung der Seren erreichte eine Art "S t e a d y s t a t e" und war damit beendet. Wie die gestrichelte Kurvenschar der Abbildung 10 zeigt, erreichten die Seren mit höherer Ausgangs-Restaktivität (Serum 1, 3, 4, 5, 6) höhere End-Spontanreaktivierungswerte als die

Seren mit niedriger Ausgangs-Restaktivität (Serum 2, 7, 8, 9) - (s. Tab. III / Spalte 4 a und 5 a).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen Normalaktivität, Vergiftbarkeit und Spontanreaktivierung der PCHE in menschlichen Seren ist nicht zu erkennen.

b) Spontanreaktivierung der Seren 1 - 9 bei 5° C (s. Tab. IV Spalte 3 -5b, Abb. 11 - gestrichelte Kurvenschar):

Auch bei den bei Kühlschranktemperatur gelagerten, mit E-600 vergifteten Seren, konnte eine Spontanreaktivierung beobachtet werden. Ausgehend von der gleichen Anfangs-Restaktivität wie bei den unter a) untersuchten Seren (0 - 35 %) lag nach 5 - 7 Tagen die Zunahme der Spontanreaktivierung zwischen 11 und 55 %. Nach 13 - 20 Tagen betrug die PCHE-Aktivität zwischen 11 und 61 % der Normalaktivität, s. Tabellé V). Die Spontanreaktivierung war bei Aufbewahrung der Seren bei 5° C noch nach 20 Tagen nicht abgeschlossen (ansteigende Tendenz der gestrichelten Kurven in Abb. 11 auch noch nach 20 Tagen). Nur in einem Fall (Serum 4) konnte keine Spontanreaktivierung beobachtet werden.

c) Vergleich der Spontanreaktivierung der Seren 1 - 9 bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen (Raumtemperatur und 5° C:

Unabhängig von der Lagerungstemperatur konnte bis auf eine Ausnahme bei allen untersuchten Seren eine Spontanreaktivierung der gehemmten PCHE festgestellt werden. Unterschiede infolge der Lagerungstemperatur ergaben sich in folgenden Punkten:

aa) Ausgehend von der gleichen Restaktivität der PCHE war in den ersten 5 - 7 Tagen der bei Raumtemperatur gelagerten Seren eine spontane Aktivitätszunahme von durchschnittlich 15 % zu verzeichnen, während die bei 5° C gelagerten Seren eine entsprechende Aktivitätszunahme von durchschnittlich nur 9 % im gleichen

Zeitraum zeigten. Allerdings fanden wir bei Seren mit hohen Ausgangs-Restaktivitäten (Serum 1,3,5,6) bei beiden Lagerungstemperaturen in den ersten 5 - 7 Tagen einen ähnlichen Verlauf der Spontanreaktivierung (vergl. gestrichelte Kurven 1 - 3 - 5 - 6 in Abb. 10 und 11).

- bb) Während die Spontanreaktivierung der bei Raumtemperatur gelagerten Seren nach 8 - 14 Tagen beendet war, zeigten die bei 5° C gelagerten Seren noch nach 20 Tagen ansteigende Tendenz der PCHE-Aktivität.
- cc) Während FRIEDBERG und SAKAI (1958) bei ihren Versuchen mit Pferdeseren eine Spontanreaktivierung der PCHE von 50 - 70 % nach in-vitro-Vergiftung mit E-600 angeben, konnten wir bei unseren Versuchen, die unter gleichen Voraussetzungen durchgeführt wurden, Werte zwischen 21 und 44 % (Raumtemperatur) und 11 bis 61 % (5° C) feststellen.

Eine Beziehung zwischen Höhe der Normalaktivität, Vergiftbarkeit mit E 600 und Spontanreaktivierung der PCHE konnte bei beiden Lagerungstemperaturen der Seren nicht gefunden werden.

Vereinfacht und schematisiert ist der Verlauf der Spontanreaktivierung in Abb. 15 a und Abb. 15 b, untere Kurven, dargestellt.

4. Reaktivierung der mit E-600, $2,33 \times 10^{-7}$ molar, vergifteten Seren 1 - 9 durch PAM

a) Methodik der Reaktivierung mit PAM:

Es sei nochmals darauf verwiesen, daß bei jedem Versuch sowohl Normalserum, als auch vergiftetes Serum, das bei Raumtemperatur bzw. 5° C gleich lang aufbewahrt worden war, sowie eine Probe des vergifteten und mit PAM reaktivierten Serums untersucht, und die dazu nötigen Arbeitsgänge parallel durchgeführt wurden.

Zur Reaktivierung wurde Pyridin-2-Aldoxim-N-Methyljodid = PAM benutzt. Die dazu verwendete Lösung von PAM war 10^{-1} molar und wurde für jeden Versuch frisch hergestellt, indem 8 mg Reinsubstanz in 0,3 ml Verdünnungslösung gelöst wurden. Der Versuchsansatz bestand jeweils aus 0,15 ml vergiftetem Serum, 1,275 ml Verdünnungslösung und 0,075 ml PAM-Lösung. Die bei allen Versuchen übliche 1 : 10 Verdünnung des Serums bleibt somit bestehen. Von diesen Versuchsansätzen wurden je 0,5 ml in die Anhangsbirnen der Kölbchen pipetiert und der Versuch durchgeführt.

Die Endkonzentration von PAM im verdünnten Serum war 5×10^{-3} molar. Trotz dieser hohen Konzentration bleibt die hemmende Wirkung von PAM auf die PCHE gering, da die AcetylcholinKonzentration hoch war (von FRIEDBERG und SAKAI (1958) für 10^{-3} molare PAM-Konzentration beschrieben). Die Inkubationszeit von PAM bis zur ersten Messung betrug bei Raumtemperatur 1 Stunde 20 Minuten. Alle vergifteten Seren wurden in den ersten 8 Tagen täglich, im weiteren Verlauf alle 2 - 3 Tage mit PAM reaktiviert.

b) V Versuchsergebnisse bei Reaktivierung der mit E 600 $2,33 \times 10^{-7}$ molar vergifteten menschlichen Seren:

Die im E 605-Vergiftungsfall II beobachtete, von der Lagerungstemperatur abhängige, zeitlich unterschiedliche Abnahme der Reaktivierbarkeit der nach Blockierung mit E 600 gehemmten PCHE, konnten wir bei unseren in-vitro-Versuchen mit menschlichen Seren ebenfalls feststellen. Ein Zusammenhang zwischen Höhe der Normalaktivität und Reaktivierbarkeit durch PAM der einzelnen Seren ließ sich nicht finden.

aa) Abnahme der Reaktivierbarkeit der bei Raumtemperatur gelagerten Seren mit PAM: Nachdem unmittelbar im Anschluß an die Vergiftung der Seren (Restaktivität zwischen 0 und 35 %) eine Reaktivierbarkeit

mit PAM auf Werte zwischen 84 % und 108 % der Normalaktivität (Werte über 100 % sind sicher auf Meßungenauigkeiten zurückzuführen) zu erzielen war, nahm innerhalb der ersten 5 - 7 Tage die Reaktivierbarkeit auf Werte zwischen 34 - 61 % ab (s. Tab.V). Die Abnahme der Reaktivierbarkeit verlief für alle Seren in diesem Zeitraum ziemlich gleich und lag für 7 Seren zwischen 31 - 44 %; nur 2 Seren zeigten starke Abweichungen (26 % bei Serum 1, 61 % bei Serum 9). Nach 8 - 13 Tagen konnte bei keinem der Seren eine Reaktivierbarkeit mit PAM erzielt werden. Im weiteren Verlauf mußten wir sogar eine zusätzliche leichte Hemmung der durch die Spontanreaktivierung wieder leicht angestiegenen PCHE-Aktivität durch PAM feststellen. Durch die - wie oben erwähnt - für alle Seren ziemlich konstante Abnahme der Reaktivierbarkeit in den ersten Tagen, sofern man sie in Prozenten der Normalaktivitäten ausdrückt und nicht in μLCO_2 , ist zu erklären, daß Seren mit höherer Ausgangs-Restaktivität (23 - 35 % bei Serum 1 - 3 - 4 - 5 - 6) bereits nach 5 - 9 Tagen, jedoch Seren mit niedriger Ausgangs-Restaktivität (0 - 8 % bei Serum 2 - 7 - 8 - 9) erst nach 9 - 13 Tagen mit PAM nicht mehr zu reaktivieren sind (Abb.10, ob.Kurven)

bb) Reaktivierung der bei 5° C gelagerten Seren mit PAM:

Hier war nach 5 - 7 Tagen noch eine Reaktivierbarkeit aller Seren auf Werte über 78 % der Normalaktivität möglich, wobei die mittlere Abnahme der Reaktivierbarkeit für alle Seren circa 2 % betrug. Auch noch nach 13 - 20 Tagen ließen sich die Seren bis auf über 60 % reaktivieren. Das Ausmaß der Reaktivierbarkeit bei den zuletzt vorgenommenen Messungen (14 -20 Tage) lag für die einzelnen Seren zwischen 45 und 98 % (Tab. V), wobei bei Seren mit höherer Ausgangs-Restaktivität die prozentualen Werte zwischen 41 und 60 % lagen und bei Seren mit

niedrigerer Ausgangs-Restaktivität zwischen 66 % und 98 %.

cc) Vergleich der Reaktivierung mit PAM der bei Raumtemperatur und 5° C gelagerten, mit E 600 vergifteten Seren 1 - 9:

Festzustellen ist, daß die Abnahme der Reaktivierbarkeit bei Lagerung der Seren bei Raumtemperatur wesentlich rascher verläuft als nach Aufbewahrung bei 5° C. Während die bei Raumtemperatur gelagerten Seren nach 5 - 13 Tagen nicht mehr reaktivierbar waren, zeigten die bei 5°C aufbewahrten Seren noch eine deutliche Reaktivierbarkeit, die für alle Seren über 60 % der Normalaktivität lag. Weiter ist festzuhalten, daß das Ausmaß der vorhandenen Reaktivierbarkeit, angegeben in Prozent der Normalaktivität, am Ende der Messungen (circa 20 Tage nach Lagerung) bei Seren mit geringerer Ausgangs-Restaktivität größer war als bei Seren mit höherer Restaktivität (Abb. 10 und 11).

Ein Zusammenhang zwischen Höhe der Normalaktivität, der Vergiftbarkeit mit E 600 und der Reaktivierbarkeit mit PAM ließ sich bei der geringen Zahl der Seren nicht erkennen.

In Abbildung 10 und 11 sowie in Tabelle III und IV sind die Ergebnisse der Punkte 2 - 4/Teil IV enthalten.

Abnahme der Reaktivierbarkeit der vergifteten Seren bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen ist vereinfacht und schematisiert in Abbildung 10, obere Kurve, und Abbildung 11, obere Kurve, dargestellt.

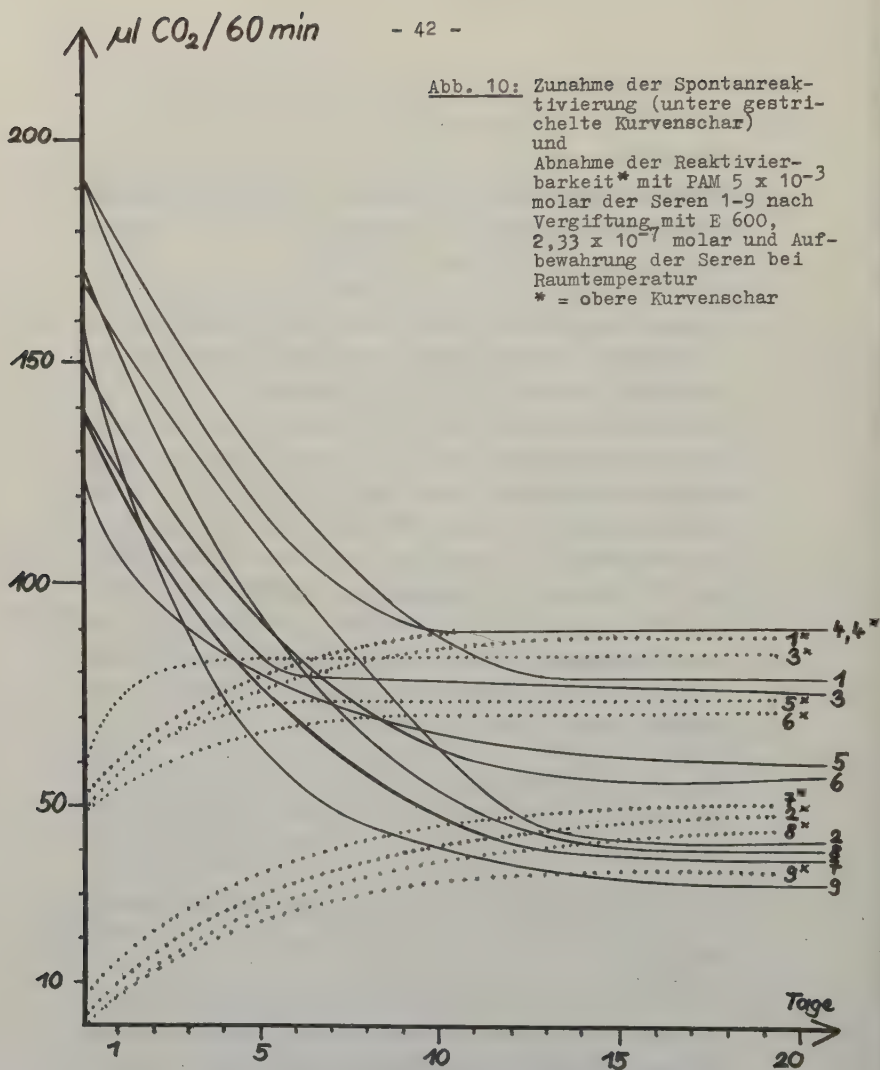


Tabelle III: Aktivität und Reaktivierbarkeit der Seren nach Vergiftung mit $2,33 \times 10^{-7}$ molarer E 600-Konzentration und Aufbewahrung der Seren bei Raumtemperatur.

1 Serum Nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2 Geschlecht	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂
3 Normalaktivität der Seren in $\mu\text{l CO}_2/60 \text{ min}$	217	172	161	208	145	153	147	183	176
4a <u>Anfangsaktivität nach Vergiftung mit E 600</u> in $\mu\text{l CO}_2/60 \text{ min}$	49	2	52	50	51	50	7	0	7
4b in % der Normalaktivität	23	0	32	25	35	32	4	0	8
5a <u>Endaktivität nach Vergiftung mit E 600</u> in $\mu\text{l CO}_2/60 \text{ min}$	82	47	45	90	62	70	46	44	36
5b in % der Normalaktivität	37	27	28	43	42	45	32	24	20
6a <u>Anfangsreaktivierbarkeit mit PAM 5×10^{-3} molar</u> in $\mu\text{l CO}_2/60 \text{ min}$	192	170	135	192	140	155	159	172	167
6b in % der Normalaktivität	89	98	84	92	97	102	108	85	95
7a <u>Endreaktivierbarkeit mit PAM 5×10^{-3} molar</u> in $\mu\text{l CO}_2/60 \text{ min}$	80	44	40	92	56	60	44	48	38
7b in % der Normalaktivität	37	26	25	44	39	39	30	26	21
8 Tage des letzten Versuchs (seit Blutentnahme)	14	16	14	19	19	10	13	12	13

Tabelle IV: Aktivität und Reaktivierbarkeit der Seren nach Vergiftung mit $2,33 \times 10^{-7}$ molarer E 600-Konzentration und Aufbewahrung der Seren im Kühlschrank bei 5°C .

1	Serum Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	Geschlecht	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂
3	Normalaktivität der Seren in $\mu\text{l CO}_2/60 \text{ min}$	217	172	161	208	145	153	146	183	176
4a	<u>Anfangsaktivität nach Vergiftung mit E 600</u> in $\mu\text{l CO}_2/60 \text{ min}$	49	2	52	50	51	50	7	0	7
4b	in % der Normalaktivität	23	0	32	25	35	32	4	0	8
5a	<u>Endaktivität nach Vergiftung mit E 600</u> in $\mu\text{l CO}_2/60 \text{ min}$	78	25	98	25	74	83	25	19	27
5b	in % der Normalaktivität	35	14	61	12	51	54	17	11	17
6a	<u>Anfangsreaktivierbarkeit mit PAM 5×10^{-3} molar in $\mu\text{l CO}_2/60 \text{ min}$</u>	192	170	135	192	140	155	159	172	167
6b	in % der Normalaktivität	89	98	84	92	97	102	108	85	95
7a	<u>Endreaktivierbarkeit mit PAM 5×10^{-3} molar in $\mu\text{l CO}_2/60 \text{ min}$</u>	147	115	125	155	110	150	141	180	147
7b	in % der Normalaktivität	67	60	77	75	76	98	96	98	89
8	Tage des letzten Versuchs (seit Blutentnahme)	29	29	29	13	20	13	10	10	10

$\mu\text{l CO}_2 / 60 \text{ min}$

Abb. 11: Zunahme der Spontanreaktivierung
(untere gestrichelte Kurvenschar)
und
Abnahme der Reaktivierbarkeit
(obere Kurvenschar) mit PAM
(5×10^{-3} molar) der Seren 1-9 nach
Vergiftung mit E 600, ($2,33 \times 10^{-4}$
molar) und Aufbewahrung der Seren
bei 50°C

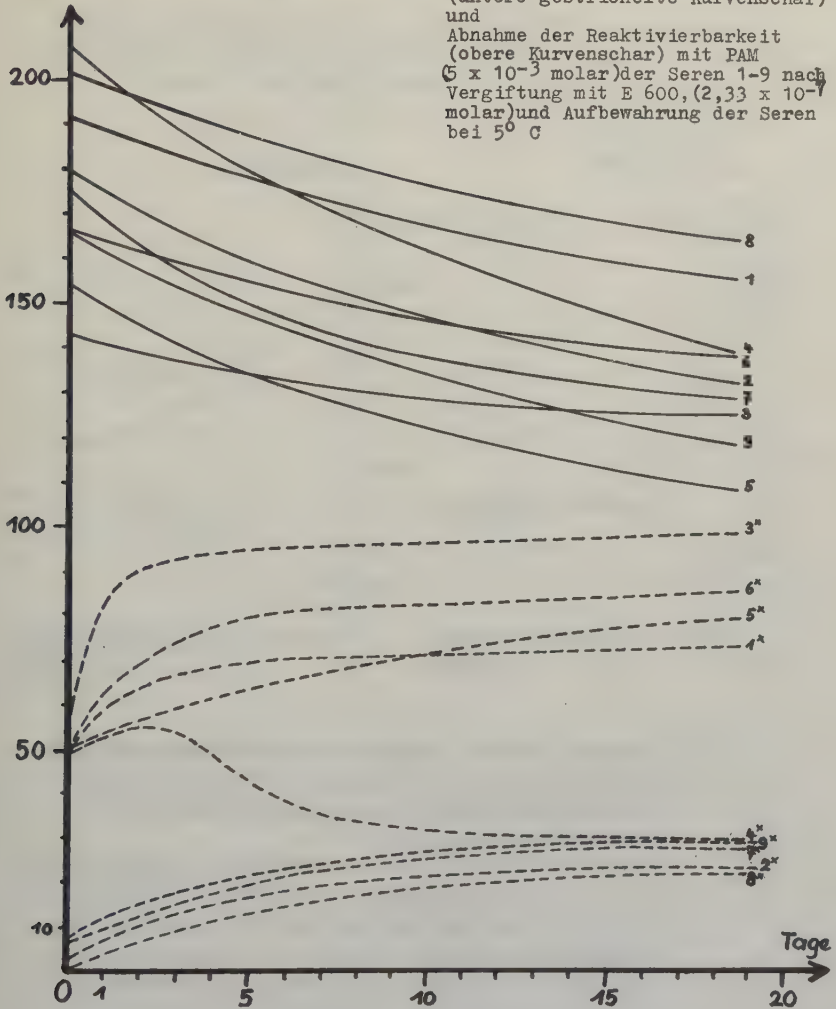
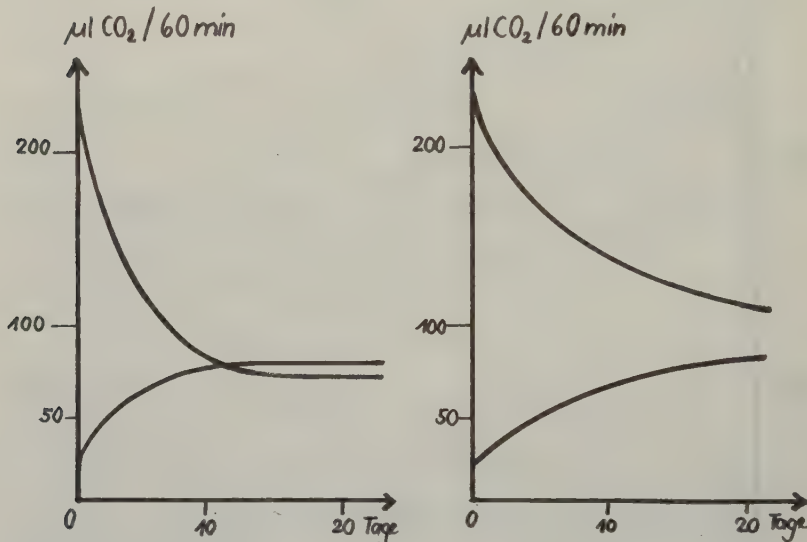


Abb. 12 a, 12 b: Schematischer Verlauf von Zunahme der Spontanreaktivierung und Abnahme der Reaktivierbarkeit nach Vergiftung menschlicher Seren mit E 600 und Lagerung der Seren bei

a) Raumtemperatur

b) 5° C



5. Vergleich zwischen Zunahme der Spontanreaktivität und Abnahme der Reaktivierbarkeit der mit E 600 vergifteten Seren unter Angabe der zeitlichen Änderung der Reaktivierungsquotienten IR

In den vorhergehenden Abschnitten wurden jeweils gleiche Vorgänge (Spontanreaktivierung oder nur Reaktivierbarkeit mit PAM) und ihre Beeinflussung durch Temperatur bei gleichbleibender E 600-Vergiftungskonzentration miteinander verglichen. In diesem Kapitel werden unterschiedliche Vorgänge wie Spontanreaktivierung und Reaktivierbarkeit mit PAM bei unterschiedlicher Temperatur und konstanter E 600-Konzentration

Tabelle V: Angabe des Verlaufes von Spontanreaktivierung und Reaktivierbarkeit mit PAM aller 9 Serien in Prozenten der Normalaktivitäten nach Lagerung

	a) <u>bei Raumtemperatur</u>	b) <u>bei +5° C</u>
Restaktivität nach Vergiftung mit E 600	0 - 35 %	0 - 35 %
Ausmaß der Spontanreaktivierung nach 5 - 7 Tagen	18 - 44 %	11 - 55 %
nach 14 - 20 Tagen	21 - 44 %	11 - 61 %
durchschnittliche Zunahme der Spontanreaktivierung nach 5 - 7 Tagen	15 %	9 %
Ausmaß der Reaktivierbarkeit mit PAM unmittelbar nach Vergiftung mit E 600	84 - 108 %	84 - 108 %
nach 5 - 7 Tagen	34 - 61 %	78 - 100 %
nach 14 - 20 Tagen	21 - 44 %	60 - 100 %
durchschnittliche Abnahme der Reaktivierbarkeit nach 5 - 7 Tagen	35 %	2 %

miteinander verglichen. Die zugrundeliegenden Meßergebnisse sind in Tabelle III, IV und V. enthalten.

a) Definition des Index der Reaktivierbarkeit:

Um ein Maß für den Vergleich zwischen Zunahme der Spontanreaktivierung und Abnahme der Reaktivierbarkeit zu erhalten, übernahmen wir den von FRIEDBERG und SAKAI eingeführten Index der Reaktivierbarkeit = IR:

$$IR = \frac{\text{PCHE-Aktivität mit E 600}}{\text{PCHE-Aktivität mit E 600 + PAM}}$$

Dieser Reaktivierungsquotient ist umso kleiner, je größer das Ausmaß der Reaktivierbarkeit und je kleiner die Zunahme der Spontanreaktivierung ist. Wird vergiftetes Serum mit PAM weder reaktiviert noch gehemmt, so ist $IR = 1$. Besteht eine komplette Hemmung der PCHE-Aktivität, so ist $IR = 0$.

Wir haben nun für sämtliche Aktivitätsmessungen der Seren 1 - 9 die Reaktivierungsquotienten im Verlauf unserer Beobachtungen errechnet (Tabelle VI). Die zeitliche Änderung der Reaktivierungsquotienten ist in Abbildung 13a und 13b für jedes Serum graphisch dargestellt.

b) Verlauf der Reaktivierungsquotienten nach Lagerung der Seren bei Raumtemperatur:

Nach 5 - 15 Tagen ist bei allen IR-Verläufen der Seren 1 - 9 der Wert 1,0 erreicht, was bedeutet, daß ab diesem Zeitpunkt die vergifteten Seren nicht mehr reaktivierbar sind.

Da nun die WARBURG-Apparatur, mit der unsere PCHE-Aktivitätsmessungen durchgeführt wurden, in mittleren und

Tabelle VI: Reaktivierungsquotienten der Seren 1 - 9 bei Messungen bis zu 29 Tagen nach Aufbewahrung der Seren bei Raumtemperatur (= a) und im Kühlschrank 5°C (= b).

IR = Serum + E 600 : Serum + E 600 + PAM

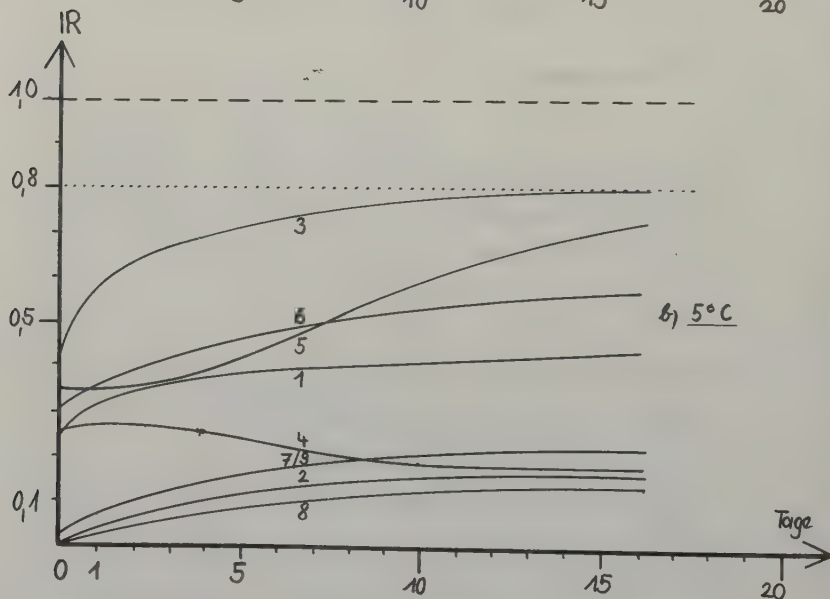
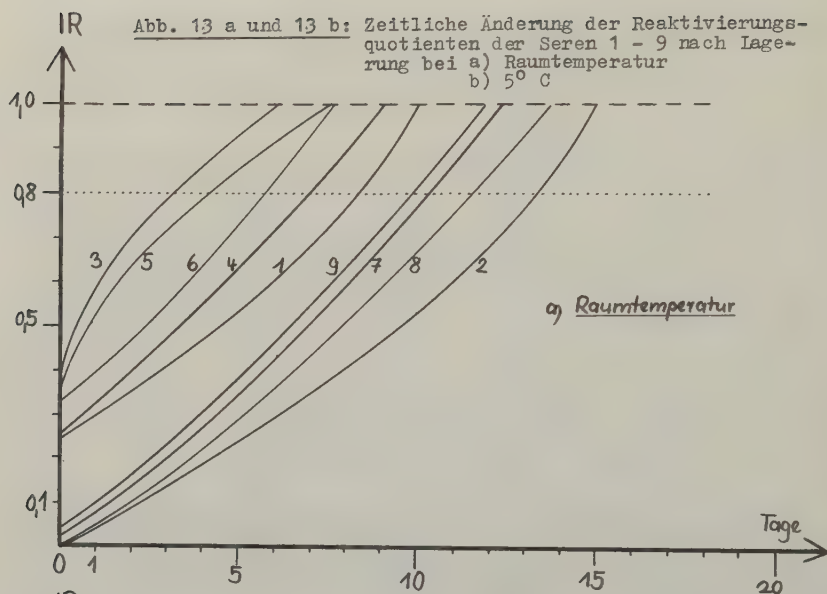
a) Raumtemperatur:

Serum Nr.	IR							
1	Tage	0,258 1	0,357 3	0,500 5	0,650 7	0,740 9	1,000 11	1,010 14
2	Tage	0,011 1	0,103 3	0,194 5	0,326 7	0,460 9	0,761 14	1,030 16
3	Tage	0,377 1	0,610 2	0,740 3	0,840 5	1,000 7	1,090 9	1,120 14
4	Tage	0,261 1	0,270 2	0,455 3	0,659 6	1,010 10	0,870 11	0,980 19
5	Tage	0,345 1	0,640 3	0,835 6	1,120 10	1,120 11	1,100 19	
6	Tage	0,324 1	0,443 3	0,789 6	0,990 10	1,117 11	1,410 19	
7	Tage	0,044 1	0,083 3	0,435 6	0,480 9	0,700 10	1,015 13	
8	Tage	0,000 1	0,036 3	0,320 6	0,500 9	0,485 10	0,920 13	
9	Tage	0,042 1	0,089 2	0,300 6	0,720 9	0,710 10	0,950 13	

b) Kühlschrank 5°C:

1	Tage	0,258 1	0,334 2	0,362 3	0,376 5	0,355 8	0,400 10	0,530 29
2	Tage	0,011 1	0,050 2	0,032 3	0,087 5	0,124 8	0,130 11	0,217 29
3	Tage	0,377 1	0,630 2	0,610 3	0,675 5	0,775 8	0,685 10	0,785 11
4	Tage	0,261 1	0,270 2	0,275 3	0,204 7	0,161 13		
5	Tage	0,350 1	0,356 3	0,446 7	0,670 13	0,701 17		
6	Tage	0,324 1	0,390 3	0,470 6	0,551 13			
7	Tage	0,044 1	0,047 3	0,180 10	0,200 16			
8	Tage	0,000 1	0,030 3	0,105 10	0,137 17			
9	Tage	0,042 1	0,035 3	0,180 10	0,237 17			

Abb. 13 a und 13 b: Zeitliche Änderung der Reaktivierungsquotienten der Serien 1 - 9 nach Lagerung bei a) Raumtemperatur
b) 5°C



hohen Meßbereichen mit einer relativ hohen systembedingten Fehlerbreite behaftet ist, muß für die sichere Diagnose einer vorliegenden Reaktivierbarkeit mit PAM bei mit E 600 vergifteten Seren ein Index der Reaktivierbarkeit gefodert werden, der auf jeden Fall kleiner ist als 0,8. Stellt man die Forderung, daß der Reaktivierungsquotient kleiner als 0,8 sein muß, bei unseren Versuchen in Rechnung, so ist - wie aus Abbildung 13a, 13b hervorgeht - bei den bei Raumtemperatur aufbewahrten Seren schon nach 3 - 14 Tagen eine eindeutige Reaktivierung mit PAM nicht mehr nachweisbar.

c) Verlauf der Reaktivierungsquotienten nach Lagerung der Seren bei 5° C:

Hier sind im Gegensatz zu b) auch nach 20 Tagen die für die Seren 1 - 9 errechneten Reaktivierungsquotienten noch unter 0,8, was bedeutet, daß bei Seren, die mit E 600 vergiftet wurden, noch nach 20-tägiger Lagerung bei Kühlschranktemperatur die Diagnose einer eindeutigen Reaktivierbarkeit mit PAM gestellt werden kann.

6. Makroskopische Veränderung der Seren

Lediglich bei vergifteten und bei Raumtemperatur aufbewahrten Seren konnten wir bei einigen nach 15 - 20 Tagen eine leichte Aufhellung und einen gelben, manchmal grünlichen Farbton beobachten. Weitere makroskopische Veränderungen sind nicht aufgefallen.

V. Diskussion

FRIEDBERG und SAKAI (1958) und FRIEDBERG und ERDMANN (1959) untersuchten in erster Linie Tierpräparate (Hirnhomogenat, Blut oder Serum). Menschliches Blut oder Hirnhomogenat wurde von FRIEDBERG und SAKAI (1958) nur in 21 Untersuchungen an 12 Todesfällen verwendet.

In unseren Versuchen wurde nur menschliches Serum verwendet, das wir mit E 600 in einer für alle Seren gleichen Konzentration von $2,33 \times 10^{-7}$ molar vergifteten. Wir erreichten dadurch bei fast allen Seren eine Hemmung der Pseudocholinesterase bis auf eine gewisse Restaktivität, und ahmten so die in der bei unseren E 605-Vergiftungsfällen gewonnene Beobachtung nach.

Die Beobachtung der zeitlichen Änderung der Spontanreaktivierung und Reaktivierbarkeit mit PAM sollten zeigen, nach welcher Zeit eine Untersuchung des Serums bei einer fraglichen Alkylphosphatvergiftung noch Aussicht auf diagnostische Verwertung hat.

Fordert man für die Diagnose einer sicheren Reaktivierbarkeit eines vergifteten Serums mit PAM einen Reaktivierungsquotienten, der kleiner als 0,8 ist, so kann es bei Lagerung des vergifteten Serums bei Raumtemperatur vorkommen, daß schon nach 3 Tagen Lagerung keine Aussage über die Möglichkeit des Vorliegens einer E 605-Vergiftung mehr gemacht werden kann. Bei Aufbewahrung der vergifteten Seren bei 5° C war dagegen der Reaktivierungsquotient noch nach 20-tägiger Lagerung kleiner als 0,8. Es empfiehlt sich daher für die gerichtsmedizinische Praxis, Untersuchungsmaterial (Serum) möglichst sofort zu untersuchen oder bei 5° C bis zur Untersuchung aufzubewahren.

Den maßgeblichen Einfluß der Körpertemperatur auf die Abnahme der Reaktivierbarkeit beschreibt LINDORF (Dissertation Erlangen 1971). Man muß demzufolge annehmen, daß die Reaktivierbarkeit der PCHE menschlichen Serums nach einer tödlichen Alkylphosphatvergiftung schon dadurch abnimmt, daß die Leiche in den ersten Stunden noch körperwarm ist.

Zwar ist der Nachweis einer, mit PAM reversiblen Hemmung, ein guter, einfacher Weg, um eine Alkylphosphatvergiftung nachzuweisen, doch sollte man bedenken, daß keine oder nur geringe Reaktivierbarkeit durch PAM nicht gegen eine solche Vergiftung spricht. Lange Aufbewahrungszeit, hohe Giftkonzentration und hohe Temperaturen beeinflussen die Untersuchungsergebnisse negativ.

VI. Zusammenfassung

Wir untersuchten bei 5 Seren von E 605-Vergiftungsfällen und bei in-vitro-Versuchen mit 9 menschlichen Seren, die mit E 600 in einer molaren Konzentration von $2,33 \times 10^{-7}$ vergiftet wurden, den Einfluß der Temperatur auf das Verhalten der gehemmten menschlichen Serumpseudocholinesterase im Hinblick auf Abnahme der Reaktivierbarkeit und Zunahme der Spontanreaktivierung. Dabei kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

a) E-605-Vergiftungsfälle

1. Im Fall I konnte das Serum erst vier Tage nach Eintritt des Todes untersucht werden. Die PCHE zeigte noch eine gewisse Restaktivität. Nach Aufbewahrung des Serums bei 5°C war noch über drei Tage eine Reaktivierung mit PAM möglich. Spontanreaktivierung konnte nicht beobachtet werden.
2. Im Fall II konnte das Serum 24 Stunden nach Vergiftung untersucht werden. Auch hier war eine gewisse Restaktivität der PCHE feststellbar. Abnahme der Reaktivierbarkeit und Zunahme der Spontanreaktivierung der gehemmten PCHE verliefen hier bei verschiedenen Lagerungstemperaturen unterschiedlich.
3. Bei 3 weiteren tödlichen E 605-Vergiftungsfällen, die ein bis drei Jahre zurücklagen, war ebenfalls in den untersuchten Seren (Lagerung im Kühlraum bei -10°C) eine geringe Restaktivität der PCHE zu beobachten.

b) In-vitro-Versuche

1. Die Normalwerte der PCHE-Aktivität unvergifteter Seren schwankten bei wiederholten Kontrollen. Ein signifikanter Unterschied der Schwankungsbreite zwischen Aufbewahrung der Seren bei Raum- und Kühlschrantemperatur war nicht feststellbar. Die Schwankungsbreite

lag im Bereich der Meßungenauigkeit der WARBURG-Apparatur.

2. Nach Vergiftung der Seren 1 - 9 einheitlich mit einer E 600 Konzentration von $2,33 \times 10^{-7}$ lag die Hemmung der Serumpseudocholinesterase zwischen 0 - 35 % der Normalaktivitäten, wobei bei 2 Seren eine totale Blockierung der PCHE vorlag.
3. Bei Vergiftung der Seren mit E 600 in der angegebenen Konzentration erfolgte eine spontane Aktivitätszunahme der PCHE in den folgenden Tagen. Dieser Vorgang wird als Spontanreaktivierung bezeichnet. Sie war bei Aufbewahrung der vergifteten Seren bei Raumtemperatur nach 10 Tagen beendet, während nach Aufbewahrung bei $+5^{\circ}\text{C}$ noch nach 15 - 20 Tagen eine ansteigende Tendenz der PCHE-Aktivität zu beobachten war.
4. Alle frisch vergifteten Seren waren mit PAM in 5×10^{-3} molarer Konzentration reaktivierbar. Nach Aufbewahrung der Seren bei Raumtemperatur war die Abnahme der Reaktivierbarkeit so rapide, daß nach 5 - 13 Tagen die Seren nicht mehr reaktiviert werden konnten, während bei Aufbewahrung der Seren bei $+5^{\circ}\text{C}$ noch nach 20 Tagen eine deutliche Reaktivierbarkeit zu beobachten war.
5. Die Spontanreaktivierung nahm bei Aufbewahrung der vergifteten Seren bei $+5^{\circ}\text{C}$ langsamer zu und die Reaktivierbarkeit langsamer ab als bei Raumtemperatur. Das Verhältnis von Zunahme der Spontanreaktivierung und Abnahme der Reaktivierbarkeit wird durch den Index der Reaktivierbarkeit = IR beschrieben. Dieser erreichte bei Aufbewahrung der Seren bei Raumtemperatur nach 5 - 14 Tagen den Wert von 1, bei Aufbewahrung der Seren bei $+5^{\circ}\text{C}$ war noch nach 20 Tagen der Wert von 0,8 nicht erreicht. (IR = 1 bedeutet: Werte für Spontanreaktivierung und Reaktivierbarkeit sind gleich.)
6. Wegen der Meßungenauigkeit der WARBURG-Apparatur muß für die Diagnose einer eindeutigen Reaktivierbarkeit ein IR kleiner als 0,8 gefordert werden. Wird dies berücksichtigt,

so ist für die bei Raumtemperatur gelagerten Seren schon nach 3 - 13 Tagen keine eindeutige Aussage über das Vorliegen einer Reaktivierbarkeit mit PAM mehr möglich.

Anhand einer größeren Anzahl von Seren ist die weitere Klärung von Fragen, die sich aus unseren Versuchen ergeben haben erforderlich:

Verhalten der PCHE des menschlichen Serums hinsichtlich Hemmung mit E 600, Spontanreaktivierung und Reaktivierbarkeit mit PAM

- a) bei höheren oder geringeren E 600-Vergiftungskonzentrationen,
- b) nach Lagerung der vergifteten Seren bei höheren oder tieferen Temperaturen,
- c) bei längerer Inkubation der vergifteten Seren mit PAM,
- d) bei höheren PAM-Konzentrationen.

VII. Literaturverzeichnis

1. AMMON R.: Die fermentative Spaltung des Acetylcholins.
Pflüg. Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934)
2. AMMON R.: ZAPP F. J.: Die einfache klinische chemische
Methode zum Nachweis von Cholinesterase im
Serum.
Klin. Wschr. 33, 759 (1955)
3. AUGUSTINSSON K. B.: Cholinesterase a study comparative
enzymology.
Acta physiol. scand. 15, Suppl. 52,1 (1948)
4. ERDMANN W. D. und L. LENDLE: Vergiftungen mit esterase-
blockierenden Insektiziden aus der Gruppe der
organischen Phosphorsäureester (E 605 und ver-
wandte).
Erg. inn. Med. und Kdhlkd. 10, 104 (1958)
5. FRIEDBERG K. D., ERDMANN W. D.: Spontane Reaktivierung
der durch Alkylphosphate (Paraoxon, Systox,
Isosystox) blockierten Cholinesterase in vitro.
Arch. exp. Path. und Pharmak. 237, 1 (1959)
6. FRIEDBERG K. D., SAKAI F.: Spezifischer Nachweis von
Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605,
Systox) in Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines
Fermentreaktivierenden Antidots (Pyridin-
Aldoxim-Methjodid, PAM).
Dtsch.Z.ges.gerichtl. Med. 47, 580 (1958)
7. GELDMACHER- v. MALLINCKRODT M., RABAST U., LINDORF H.:
Unterschiedliche Empfindlichkeit menschlicher
Serumcholinesterasen gegen E 600 (O,O-Diäthyl-
-O-(p-Nitrophenyl)-Phosphat).
Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

8. GOEDDE H. W., DOENICKE A., ALTLAND K.: Pseudocholinesterasen (Pharmakogenetik, Biochemie, Klinik).
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967)
9. HOBBIGER F.: Effect of nicotinhydroxamic acid methiodide on human plasma cholinesterase inhibited by organophosphates containing a dialkylphosphatogroup.
Brit. J. Pharmacol. 10, 356 (1955)
10. KALOW W., DAVIES R. O.: The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase.
Biochem. Pharmacol. 1, 183 (1958)
11. KEWITZ H.: Die Wiederherstellung der Cholinesterase-Aktivität bei der Alkylphosphatvergiftung durch ein spezifisches Antidot.
Klin. Wschr. 35, 521 (1957)
12. LINDORF H.: Dissertation Erlangen, in Vorbereitung
13. LORKE D., KIMMERLE G.: Die Toxikologie der insektiziden Phosphorsäureester.
Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 21, 111 (1968)
14. PRIBILLA O.: Vergiftungen mit E 605
Arch. Toxikol. 15, 210 (1955)
15. RABAST U.: Hemmung der menschlichen Serum-Pseudocholinesterase in vitro durch E 600 und ihre Reaktivierbarkeit mit PAM unter Berücksichtigung von Temperatur, Zeit und E 600-Konzentration.
Dissertation Erlangen 1970
16. SCHRADER G.: Die insektiziden Phosphorsäureester.
Angew. Chem. 69, 86 (1957)

17. SÜLLMANN H.: Manometrische Methoden zur Untersuchung des Gewebsstoffwechsels.
in
Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse, herausgegeben von K. LANG und E. LEHNARTZ, Band VI A, Teil A.
Springer-Verlag, Berlin (1964)
18. WILSON I. B. and S. GINSBURG: Reaktivtion of acetylcholinesterase inhibited by alkylphosphate.
Arch. Biochem. 54, 569 (1955)
19. WIRTH W.: Zur Pharmakologie der insektiziden Phosphorsäureester.
Verh. dtsh. Ges. Arbeitsschutz 2, 101 (1954)
20. WIRTH W.: Zum Nachweis der E-605-Intoxikation.
Arch. Toxikol. 16, 125 (1956)

Herrn Professor Dr. Dr. E. W e i n i g , Direktor des Instituts für Gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen-Nürnberg, danke ich für die freundliche Unterstützung durch Überlassung eines Arbeitsplatzes, für die mir zuteil gewordene finanzielle Hilfe während meiner Tätigkeit im Gerichtsmedizinischen Institut, für wertvolle Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit und für die Übernahme des Coreferates.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Dr. M. G e l d m a c h e r - v. M a l l i n c k r o d t für die Überlassung dieses Themas, für die bereitwillige Einführung in die Problematik, für die Einarbeitung an der Warburg-Apparatur und für den stets freundlich erteilten Rat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. L o r k e von der Firma Bayer für das zur Verfügung gestellte PAM und E 600.

Lebenslauf

Am 11. April 1942 wurde ich als zweites Kind des Oberlehrers Hermann Weiß und seiner Ehefrau Therese Weiß, geb. Rappl, in Traunstein/Oberbayern geboren.

Meine Kindheit verlebte ich in Schleching/Oberbayern, wo ich die Volksschule von 1948 bis 1952 besuchte, um im Jahre 1952 in die nahegelegene Oberrealschule Marquartstein überzutreten. 1957 verstarb meine Mutter, 1958 mein Vater. Von 1958 bis 1961 besuchte ich die Ohm-Oberrealschule Erlangen, an der ich mein Reifezeugnis 1961 erhielt. Im November 1961 begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg mit dem Studium der Medizin. Hier bestand ich im Juli 1962 das Vorphysikum, im März 1964 das Physikum und im Juli 1968 das medizinische Staatsexamen. Im Januar 1970 erhielt ich nach Ableistung meiner Medizinalassistentenzeit die Approbation als Arzt.

Mein weiteres Berufsziel ist die Ausbildung zum Facharzt für Unfallchirurgie (eventuell Orthopädie).

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990